

**Rôles de SRp30c et hnRNP I/PTB dans le contrôle de l'épissage  
alternatif du pré-ARN messenger de hnRNP A1.**

Par

Caroline Paradis

Département de microbiologie et d'immunologie

Laboratoire du Dr Benoit Chabot

Mémoire présenté à la Faculté de médecine

en vue de l'obtention du grade de

maître ès sciences (M.Sc.) en microbiologie

3 janvier 2007



Library and  
Archives Canada

Bibliothèque et  
Archives Canada

Published Heritage  
Branch

Direction du  
Patrimoine de l'édition

395 Wellington Street  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada

395, rue Wellington  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada

*Your file    Votre référence*

*ISBN: 978-0-494-26032-6*

*Our file    Notre référence*

*ISBN: 978-0-494-26032-6*

#### NOTICE:

The author has granted a non-exclusive license allowing Library and Archives Canada to reproduce, publish, archive, preserve, conserve, communicate to the public by telecommunication or on the Internet, loan, distribute and sell theses worldwide, for commercial or non-commercial purposes, in microform, paper, electronic and/or any other formats.

The author retains copyright ownership and moral rights in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

#### AVIS:

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque et Archives Canada de reproduire, publier, archiver, sauvegarder, conserver, transmettre au public par télécommunication ou par l'Internet, prêter, distribuer et vendre des thèses partout dans le monde, à des fins commerciales ou autres, sur support microforme, papier, électronique et/ou autres formats.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

---

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms may have been removed from this thesis.

Conformément à la loi canadienne sur la protection de la vie privée, quelques formulaires secondaires ont été enlevés de cette thèse.

While these forms may be included in the document page count, their removal does not represent any loss of content from the thesis.

Bien que ces formulaires aient inclus dans la pagination, il n'y aura aucun contenu manquant.

  
**Canada**

*Une leçon de vie que la recherche m'a enseignée :*

*« You can't connect the dots looking forward; you can only connect them looking backwards. So you have to trust that the dots will somehow connect in your future. You have to trust in something - your gut, destiny, life, karma, whatever... »*

*Steve Jobs*

# Table des matières

Table des matières.....	I
Liste des schémas et des figures.....	III
Liste des abréviations.....	V
Résumé.....	VII
<b>Introduction.....</b>	<b>1</b>
L'épissage: un mécanisme d'une envergure phénoménale.....	1
L'épissage constitutif.....	4
L'épissage alternatif.....	7
Modulateurs de l'épissage alternatif.....	9
Les protéines SR.....	11
Les protéines hnRNPs.....	15
La protéine hnRNP A1.....	16
La protéine hnRNP I/PTB .....	17
La régulation du pré-ARNm de hnRNP A1.....	21
Le contrôle du pré-ARNm de hnRNP A1 par CE9 et SRp30c .....	24
La régulation de l'épissage alternatif par la protéine SRp30c.....	28
<b>Matériel et méthodes.....</b>	<b>31</b>
Constructions plasmidiques pour réactions d'épissage.....	31
Constructions plasmidiques pour protéines recombinantes.....	31
Séquence des oligonucléotides.....	32
Transcription <i>in vitro</i> .....	34



Réactions d'épissage <i>in vitro</i> .....	35
Production de protéines recombinantes.....	36
Gel de protéine .....	<b>39</b>
Immunobuvardage de type Western.....	39
SELEX.....	40
Marquage des oligonucléotides.....	42
Gel de retardement et essai de liaison par rétention sur colonne .....	42
Chromatographie d'affinité.....	43
Spectrométrie de masse.....	44
Pontage aux ultraviolets.....	45
<b>Résultats</b> .....	<b>46</b>
SRp30c et ASF/SF2 modulent l'activité de l'élément CE9.....	46
Identification d'un site de haute affinité pour la protéine SRp30c.....	48
Plusieurs sites de liaison pour SRp30c reproduisent l'activité de CE9.....	<b>52</b>
PTB agit comme antagoniste de l'activité de répression de SRp30c.....	59
<b>Discussion</b> .....	<b>69</b>
Un site de liaison optimal pour la protéine SRp30c.....	69
L'activité de répression par la protéine SRp30c et l'élément CE9.....	71
La protéine hnRNP I/PTB comme anti-répresseur de SRp30c.....	73
La régulation de l'épissage par des facteurs antagonistes.....	79
<b>Conclusion</b> .....	<b>81</b>
Remerciements.....	83
Références.....	84

## Liste des schémas et des figures

Schéma 1 .....	3
Schéma 2 .....	5
Schéma 3 .....	8
Schéma 4 .....	10
Schéma 5 .....	11
Schéma 6 .....	18
Schéma 7 .....	20
Schéma 8 .....	21
Schéma 9 .....	23
Schéma 10 .....	25
Schéma 11 .....	27
Schéma 12 .....	78
Tableau 1 .....	13
Tableau 2 .....	70
Figure 1 .....	47
Figure 2 .....	50
Figure 3 .....	52
Figure 4 .....	53
Figure 5 .....	55
Figure 6 .....	58
Figure 7 .....	61

Figure 8 .....	63
Figure 9 .....	65
Figure 10 .....	67
Figure 11.....	68

## Listes des abréviations

ADN	Acide Désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
ADN	ADN simple brin
ARN	Acide Ribonucléique
ARNm	ARN messenger
ATP	Adénosine triphosphate
Bcl	« B cell lymphoma »
°C	Degrès Celsius
CE	« Conserved Element »
dNTP	Désoxyribonucléotide triphosphate
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylènediaminetétracétate
GST	Gluthathione S-transférase
HEPES	Acide 4-2-hydroxyéthyl-1-piperazineéthanesulfonic
His	Étiquette de 6 X histidine
hnRNP	« heterogeneous nuclear Ribonucleoprotein »
IPTG	Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside
kDa	Kilodalton
LB	Milieu Luria-Bertani
M	Molaire (moles / litre)
ml	Millilitre

ng	nanogramme
nt	Nucléotides
N-terminal	Amino-terminal
Oligo	Oligonucléotide
<sup>32</sup> P	Isotope de phosphate radioactif
pb	Paires de bases
PCR	« Polymerase Chain Reaction »
PMSF	Phenylmethylsulfonyl fluoride
Pré-ARNm	ARN messenger précurseur
PTB	« Polypyrimidine tract binding protein »
RNAi	« RNA interference »
rpm	rotation par minute
RRM	« RNA recognition motif »
RT	« Reverse Transcription »
SDS	Sodium dodécyl sulfate
SELEX	« Systematic Evolution of Ligands by Exponential enrichment »
SF1/mBBP	« Splicing Factor / mammalian Branch point Binding Protein »
snRNA	« small nuclear RNA »
snRNP	« small nuclear Ribonucleoprotein »
SR	Sérine-Arginine
U2AF	« U2 auxiliary factor »

## Résumé

L'épissage alternatif des pré-ARN messagers est un mécanisme qui permet de générer une très grande diversité protéique chez les eucaryotes supérieurs. La sélection des sites d'épissage permet ainsi de produire certains isoformes protéiques plutôt que d'autres dans des conditions précises. Cette modulation implique généralement la participation d'une multitude de facteurs aux propriétés parfois synergiques et/ou antagonistes. Dans le cas du pré-ARN messenger hnRNP A1, au moins trois éléments distincts renforcent l'exclusion de l'exon 7B. Par contre, l'élément intronique conservé de 38 nt (CE9) situé en aval de l'exon 7B permet la répression du site d'épissage 3', ce qui entraînerait l'inclusion de l'exon 7B. La portion 5' de l'élément CE9 est liée par la protéine SRp30c et cette interaction est importante pour permettre l'activité de CE9 *in vitro*.

Afin de déterminer les composantes essentielles à l'activité de répression de SRp30c, des sites de liaison de haute affinité pour cette protéine ont été identifiés à l'aide de la procédure « SELEX ». Les résultats obtenus indiquent que plusieurs sites de haute affinité reproduisent l'activité de l'élément CE9 complet dans un essai d'épissage où deux sites d'épissage 3' sont en compétition pour un seul site d'épissage 5'. De plus, les résultats suggèrent une contribution de la portion 3' de CE9, en plus de la partie 5', pour la liaison de la protéine SRp30c. En utilisant la séquence complète de CE9 pour effectuer une chromatographie d'affinité, la protéine hnRNP I/PTB a été isolée et identifiée par spectrométrie de masse. Cependant, nous avons été surpris de constater que la protéine

recombinante PTB agit comme activateur du site d'épissage 3' en diminuant l'activité de répression de CE9. Ces résultats suggèrent donc un nouveau rôle pour la protéine PTB, c'est-à-dire comme anti-répresseur de l'activité d'inhibition de SRp30c. PTB pourrait donc être un nouveau facteur capable de contrôler l'épissage alternatif du pré-ARN messenger de hnRNP A1.

**Mots clés :** épissage alternatif, répresseur, ARN pré-messenger hnRNP A1, SRp30c, hnRNP I/PTB.

# Introduction

## L'épissage : un mécanisme d'une envergure phénoménale

Chez les eucaryotes supérieurs, le nombre de gènes présent dans un organisme donné ne corrèle pas avec la diversité protéique générée par celui-ci. L'être humain est probablement un des exemples les plus fascinants pour illustrer la discordance existant entre la quantité de gènes et la panoplie de protéines produite à partir de son génome. Suite au séquençage du génome humain, cet écart s'est avéré considérablement plus grand que ce qui avait été imaginé. Contre toute attente, l'analyse du génome a révélé un nombre relativement modeste de gènes en comparaison à la quantité de protéines anticipées comme nécessaires au fonctionnement d'un organisme aussi complexe que l'humain. Le génome humain ne contiendrait pas plus de 20 000 à 40 000 gènes, soit à peine plus que le nombre de gènes du vers *C. elegans* (~19 000 gènes) et probablement moins que le génome de la plante *Arabidopsis Thaliana* (~25 000 gènes), alors que le nombre de protéines est estimé à des centaines de milliers (Lander et al., 2001).

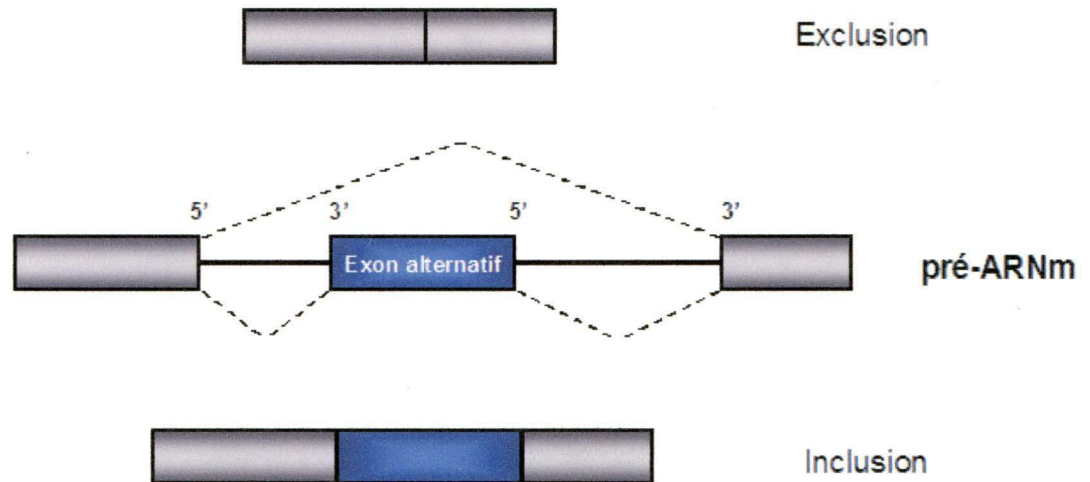
Or, comment expliquer qu'un génome si limité arrive à conférer cette complexité extraordinaire chez l'humain? Les recherches actuelles soutiennent une contribution, jusqu'ici sous-estimée, des mécanismes de modifications post-transcriptionnelles de l'ARN. Parmi ces modifications, on retrouve entre autres l'ajout d'une coiffe en 5',



l'édition de certains nucléotides, la polyadénylation de l'extrémité 3' et l'épissage de l'ARN. Actuellement, une attention particulière est de plus en plus portée vers l'épissage alternatif. L'épissage est un mécanisme qui permet d'enlever les introns (correspondant généralement aux parties non-codantes) d'un pré-ARNm et d'en joindre les exons (correspondant habituellement aux portions codantes). Dans le cas de l'épissage alternatif, des variantes dans l'utilisation des sites d'épissage sont possibles et permettent de créer des isoformes différents à partir d'un même pré-ARNm. Ce processus permet par exemple de garder ou d'exclure un exon alternatif d'un pré-ARNm en produisant ainsi deux isoformes différents qui pourront être exprimés dans des proportions différentes selon les conditions présentes à l'intérieur d'une cellule (Schéma 1). Un même pré-ARNm peut contenir plusieurs exons alternatifs et générer à lui seul une multitude de protéines. C'est ainsi que le dogme « un gène encode une protéine » est maintenant remplacé par « un gène encode un pré-ARNm ». Ce même pré-ARNm peut ensuite subir des événements d'épissage alternatif lui permettant de générer une variété de protéines ayant des fonctions similaires, différentes ou parfois même entièrement antagonistes.

L'épissage alternatif est unanimement considéré comme étant un mécanisme d'une importance phénoménale en ce qui a trait à la génération de la diversité protéique chez l'humain. En 1994, l'estimation du pourcentage de gènes épissés de manière alternative était évaluée à moins de 5 % (Sharp, 1994). En 2003 ce pourcentage passait à plus de 73% (Johnson et al., 2003) et en 2004, d'autres études corroboraient ce chiffre en estimant les événements d'épissage alternatif supérieurs à 80% (Kampa

et al., 2004). L'épissage alternatif s'est donc avéré un évènement beaucoup plus fréquent qu'il avait d'abord été imaginé et les études à ce sujet ont connu un essor



**Schéma 1. Production de deux isoformes à partir d'un même pré-ARNm par épissage alternatif.** Les exons sont représentés par des boîtes tandis que les introns par une ligne continue. Les sites d'épissage 5' et 3' sont aussi indiqués et les variantes dans l'utilisation de ces sites sont représentées par les lignes pointillées. Dans cet exemple, il peut y avoir soit exclusion ou soit inclusion de l'exon alternatif (en bleu) à partir d'un seul pré-ARNm menant ainsi à la production de deux isoformes protéiques distincts.

fulgurant au cours des dernières années. Outre la diversité protéique générée par épissage alternatif, l'importance d'étudier l'épissage est aussi reflétée par le fait qu'au moins 15%, et peut-être même jusqu'à 50%, des maladies génétiques humaines sont causées par des mutations dans les séquences consensus des sites d'épissage ou encore dans les séquences régulatrices de l'épissage (Caceres et Kornblihtt, 2002; Cartegni et al., 2002; Faustino et Cooper, 2003; Lopez-Bigas et al., 2005; Pagani et Baralle, 2004). Malgré les progrès considérables dans la compréhension de l'épissage, beaucoup d'efforts devront être consacrés à élucider les mécanismes responsables de

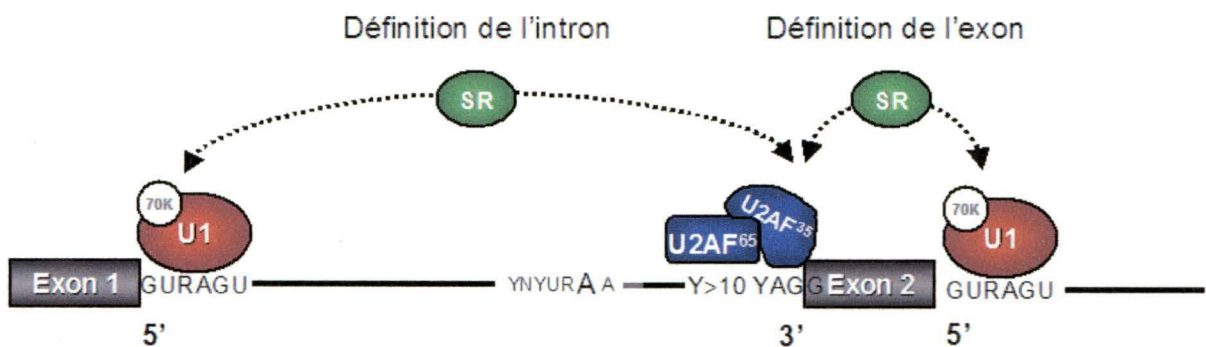
cette régulation exceptionnelle. Ainsi, plusieurs études visent à déterminer des séquences régulatrices à l'intérieur d'un pré-ARNm ainsi qu'à identifier les facteurs impliqués dans les différentes étapes de régulation. Des approches complémentaires dites « globales » permettent aussi d'effectuer des analyses à l'échelle génomique en détectant un grand nombre d'évènements d'épissage alternatif ou encore en déterminant de nombreuses cibles pour des facteurs de régulation spécifiques. Toutes ces études permettent de mieux saisir la complexité des modulations à l'œuvre lors des évènements d'épissage alternatif. Il est espéré qu'en cumulant l'ensemble de ces recherches, il sera possible de dresser un tableau plus clair de la régulation de l'épissage alternatif dans une cellule donnée dans certaines conditions précises.

Les sections suivantes définiront plus en détail l'épissage constitutif ainsi que l'épissage alternatif. Des modulateurs de l'épissage seront aussi présentés avant d'introduire un pré-ARNm modèle pour l'étude de l'épissage alternatif : le pré-ARNm de hnRNP A1. Les différents mécanismes de régulation du pré-ARNm de hnRNP A1 mèneront ensuite à élaborer sur la modulation de l'épissage alternatif par l'élément intronique CE9 et la protéine SRp30c, qui sont à l'étude pour ce projet de recherche.

### **L'épissage constitutif**

Un gène humain typique contiendrait environ huit exons d'une longueur moyenne de 145 nt, alors que les introns seraient en moyenne vingt fois plus grand (Lander et al., 2001). Sachant qu'une erreur d'un seul nucléotide peut changer complètement le

cadre de lecture d'un ARNm et ainsi avoir des conséquences physiologiques catastrophiques sur la production de protéines fonctionnelles, le mécanisme pour exciser les introns doit être très précis et bien régulé. Tout d'abord, il existe de courtes séquences consensus quelque peu dégénérées aux extrémités des introns qui définissent le site d'épissage 5', le site d'épissage 3', le site de branchement ainsi que la séquence riche en pyrimidine (Schéma 2). La reconnaissance des sites d'épissage 5' et 3' est respectivement effectuée par le snRNP U1 et U2AF. Cette étape est



**Schéma 2. Reconnaitement des sites d'épissage 5' et 3' par le snRNP U1 et U2AF respectivement.** Les séquences consensus pour les sites d'épissage 5' et 3' ainsi que la région riche en pyrimidines et le site de branchement sont indiqués. Les sites d'épissage 5' et 3' sont respectivement reconnus par le snRNP U1 et U2AF. Les protéines SR peuvent interagir simultanément avec la sous-unité de 70 kDa du snRNP U1 ainsi qu'avec U2AF<sup>35</sup>, ce qui permettrait la définition de l'intron et la définition de l'exon représentées par les flèches en lignes pointillées.

communément appelée le complexe d'engagement ou complexe E et elle initie l'assemblage du spliceosome (la machinerie de l'épissage). Le spliceosome est composé de cinq snRNP soit les snRNP U1, U2, U4, U5 et U6 ainsi que plusieurs autres protéines n'étant pas directement associées aux snRNPs. La liaison du snRNP

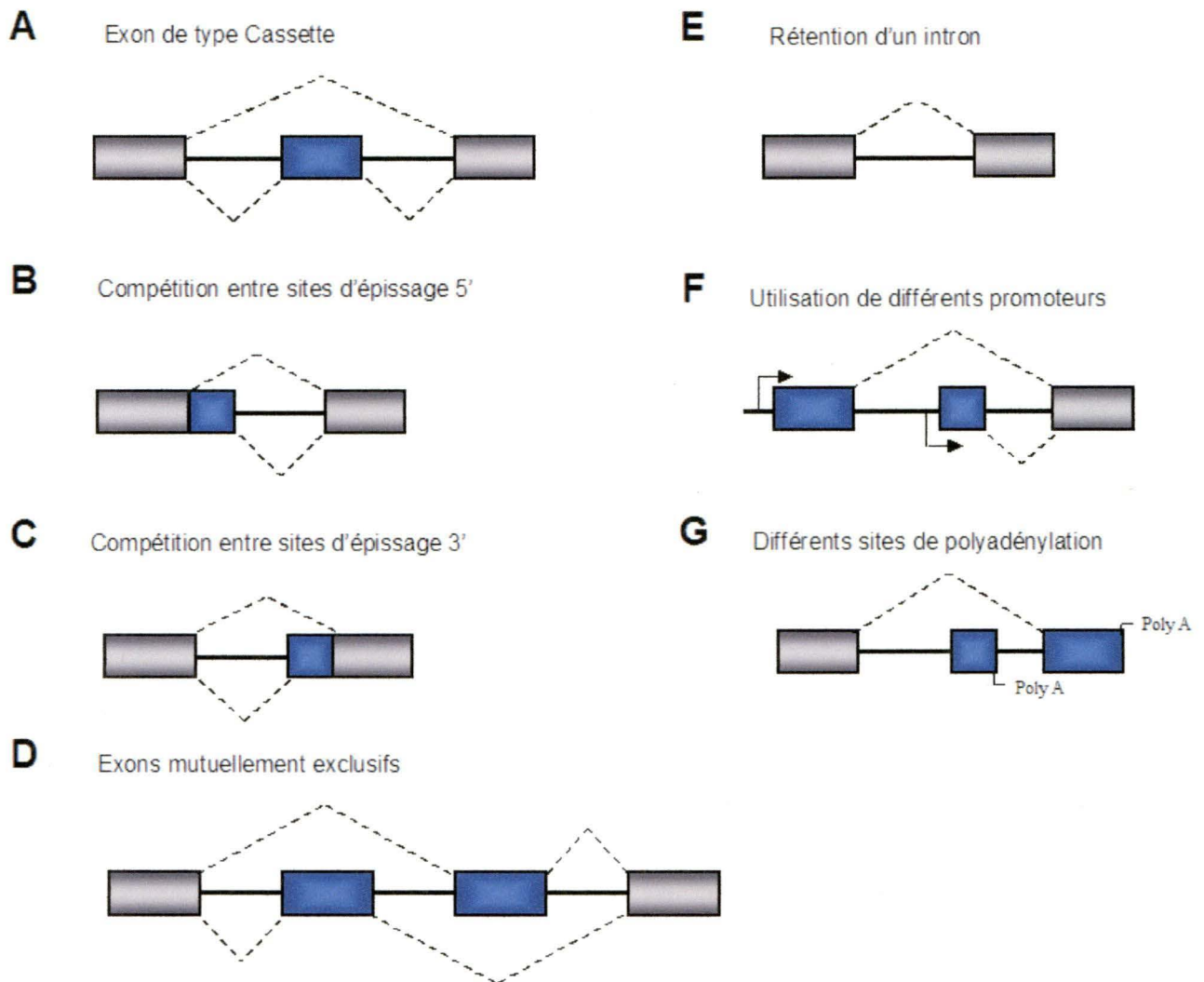
U1 au site d'épissage 5' consiste en une interaction ARN-ARN, alors que la reconnaissance du site d'épissage 3' est effectuée par un facteur auxiliaire au snRNP U2, U2AF, qui est composé de deux sous-unités : U2AF<sup>35</sup> et U2AF<sup>65</sup>. Tel que représenté sur le schéma 2, ces deux sous-unités reconnaissent respectivement le dinucléotide AG du site d'épissage 3', ainsi que la région riche en pyrimidines (Merendino et al., 1999; Wu et al., 1999; Zorio et Blumenthal, 1999). La protéine U2AF ainsi que la protéine de 70 kDa associée au snRNP U1 contiennent toutes deux un domaine riche en résidus arginine et sérine qui leur permettraient d'interagir avec des domaines similaires retrouvés chez les membres de la famille des protéines SR. Il a été montré que certaines protéines SR pouvaient interagir à la fois avec les protéines U2AF et U1-70kDa suggérant que les protéines SR serviraient d'intermédiaires pour effectuer la communication entre les sites d'épissage 5' et 3' afin de définir les régions introniques (Chabot, 1996) (Schéma 2). Ces interactions seraient aussi possibles pour faciliter la définition des régions exoniques où la liaison du snRNP U1 au site d'épissage 5' stimulerait la liaison de U2AF au site d'épissage 3' (Berget, 1995) (Schéma 2). Le site de branchement serait quant à lui initialement reconnu par la protéine SF1/mBBP (Berglund et al., 1998). Une fois toutes ces protéines en place, SF1/mBBP serait déplacé par le snRNP U2 qui s'associerait à son tour au site de branchement pour former le complexe A. Il y aurait ensuite formation du complexe B par l'arrivée du tri-snRNP U4, U5 et U6. U6 remplace alors le snRNP U1 au site d'épissage 5' et interagit simultanément avec U2, ce qui positionnerait le site de branchement près du site d'épissage 5' en préparation à l'attaque nucléophile. Cette étape provoquerait donc un changement conformationnel du pré-ARNm qui

permettrait d'amorcer les deux réactions successives de transestérification requises pour l'excision de l'intron et la ligation des deux exons. (Ares et Weiser, 1995; Nilsen, 1994).

### **L'épissage alternatif**

L'épissage alternatif permet la production de variantes dans l'utilisation des sites d'épissage et engendre la production d'isoformes différents à partir d'un même pré-ARNm. Le schéma 1 illustre l'exemple d'un pré-ARNm possédant un exon alternatif qui peut être soit inclus ou soit exclus de l'ARN messenger mature. Il existe d'autres formes d'épissage alternatif qui sont représentées dans le schéma 3. Il peut s'agir d'un exon alternatif cassette qui possède à la fois un site d'épissage 3' et 5' étant chacun entouré d'un intron (Schéma 3A). Cet exon alternatif peut être inclus ou exclus de l'ARNm. Une compétition entre deux sites d'épissage, soit 5' (Schéma 3B) ou 3' (Schéma 3C), permet l'inclusion ou l'exclusion de portions seulement d'un exon dans l'ARNm. Des pré-ARNm contenant des exons mutuellement exclusifs existent aussi (Schéma 3D). Il arrive aussi qu'il y ait rétention d'un intron situé entre deux exons constitutifs (Schéma 3E). L'utilisation de différents promoteurs (Schéma 3F) ou de différents sites de polyadénylation (Schéma 3G) peut aussi influencer la sélection des sites d'épissage (revu dans (Matlin et al., 2005)). Ces exemples illustrent donc en partie la versatilité des événements d'épissage alternatif présents à l'intérieur d'une cellule ainsi que la panoplie de mécanismes devant être régulée. Certains gènes épissés alternativement peuvent engendrer une multitude d'isoformes. L'exemple le

plus déconcertant est sans doute celui du gène *Dscam* qui, chez la drosophile, contient 95 exons alternatifs et peut potentiellement mener à la formation de plus de 38 000 ARNm différents (Schmucker et al., 2000). Il est à souligner que les isoformes



**Schéma 3. Représentation de différentes formes d'épissage alternatif.**  
Cette illustration est adaptée de Matlin et al, 2005.

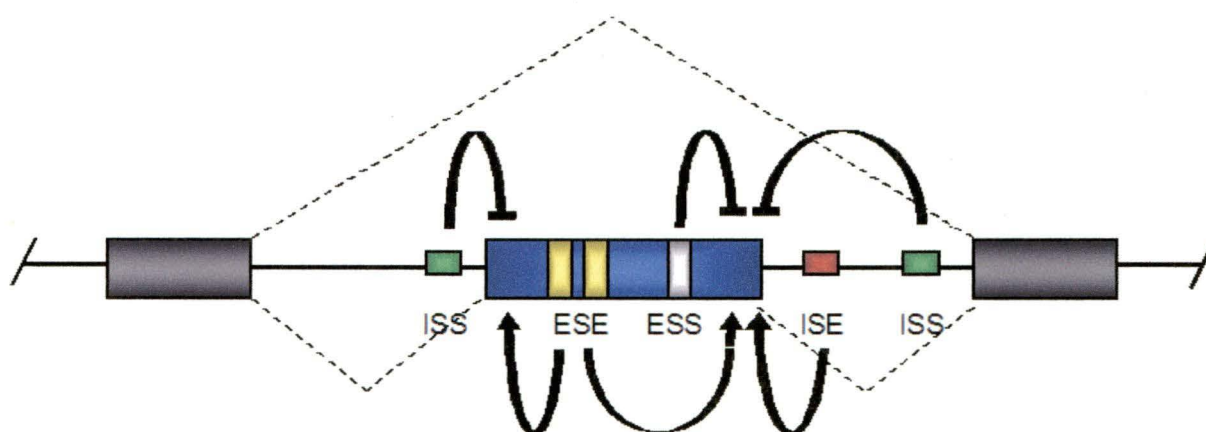
produits par épissage alternatif ont parfois des propriétés diamétralement opposées, comme dans le cas du gène Bcl-x. L'épissage alternatif du pré-ARNm de Bcl-x peut engendrer deux protéines différentes, Bcl-x<sub>S</sub> et Bcl-x<sub>L</sub>, qui possèdent respectivement des activités menant à la mort cellulaire (apoptotique) ou encore à la survie de la cellule (anti-apoptotique) (Boise et al., 1993). Ce dernier exemple montre clairement les enjeux liés à une régulation précise de l'épissage alternatif puisque l'intégrité de la cellule ou de l'organisme en dépend bien souvent.

### **Modulateurs de l'épissage alternatif**

La modulation adéquate des événements d'épissage alternatif étant de la plus haute importance pour le fonctionnement de tout organisme eucaryote, plusieurs stratégies sont employées pour la sélection des sites d'épissage. Un grand nombre d'études a permis de mettre en évidence l'importance d'une coordination entre des séquences dites « inhibitrices » et des séquences dites « activatrices » situées sur le pré-ARNm (revus dans (Black, 2000, 2003; Chabot, 1996; Chabot et al., 2003; Matlin et al., 2005; Smith et Valcarcel, 2000) (Schéma 4). Ces éléments activateurs ou inhibiteurs peuvent être situés soit à l'intérieur d'un exon ou d'un intron. On nomme ces éléments « exonic splicing enhancer » (ESE), « intronic splicing enhancer » (ISE), « exonic splicing silencer » (ESS) et « intronic splicing silencer » (ISS) (revu dans (Matlin et al., 2005). Le schéma 4 illustre d'ailleurs la combinaison des différents éléments pouvant être impliqués dans la régulation d'un seul exon alternatif. Ces éléments qualifiés de « *cis* » ont souvent la capacité de recruter des facteurs « *trans* » afin de



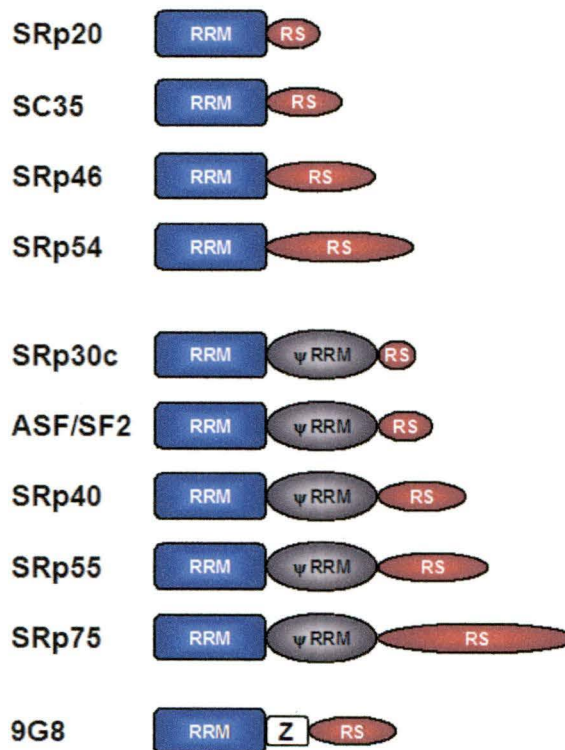
réguler l'épissage alternatif. Il existe effectivement différentes protéines pouvant lier ces éléments activateurs ou inhibiteurs de l'épissage. Parmi ces protéines, les protéines SR et les protéines hnRNPs sont reconnues pour affecter la sélection des sites d'épissage via ces types d'éléments. Les protéines SR étant généralement considérées comme des activateurs et les protéines hnRNP comme des inhibiteurs. Cependant, cette pensée dichotomique de classification est maintenant considérée avec prudence puisque de plus en plus d'études ont montré que les protéines SR pouvaient aussi agir comme des répresseurs et vice-versa pour les protéines hnRNPs. Les sections suivantes s'attarderont donc à décrire plus précisément ces deux classes de protéines en donnant des exemples de régulation de l'épissage pour chacune d'entre elles.



**Schéma 4. Illustration de plusieurs éléments pouvant influencer la sélection des sites d'épissage alternatif.** Ces éléments peuvent se retrouver dans des exons ou des introns et être des activateurs ou des inhibiteurs. Ils sont communément appelés les « exonic splicing enhancer » (ESE), « exonic splicing silencer » (ESS), « intronic splicing enhancer » ainsi que les « intronic splicing silencer » (ISS). Ce schéma est adapté de Matlin et al, 2005.

## Les protéines SR

Les protéines SR (Sérine-Arginine) constituent une famille de protéines comprenant environ une dizaine de membres. Tel que représenté au schéma 5, ces protéines possèdent généralement un ou deux domaines de liaison à l'ARN (RRM) à leur extrémité amino-terminal ainsi qu'un domaine RS en carboxy-terminal. Le domaine RS consiste en plusieurs répétitions des résidus sérine et arginine et serait impliquée dans l'interaction avec d'autres protéines possédant un domaine similaire (revu dans (Graveley, 2000)). Rappelons-nous que ce serait entre autres grâce aux protéines SR



**Schéma 5. Représentation de dix membres de la famille des protéines SR.** Tel qu'indiqué, les protéines SR possèdent au moins un domaine de liaison à l'ARN (RRM) ainsi qu'un domaine RS reconnu pour l'interaction avec d'autres protéines. La taille du domaine RS varie d'une protéine SR à l'autre. Ce schéma est adapté de Graveley, 2000.

qui pourraient interagir avec la sous-unité de 70 kDa du snRNP U1 et avec la sous-unité U2AF<sup>35</sup> (Schéma 2), pour faciliter la communication entre les sites d'épissage 5' et 3' (revu dans (Graveley, 2000)). Il a aussi été démontré que les protéines SR contribueraient au recrutement du snRNP U1 au site d'épissage 5' pour ainsi faciliter la formation du complexe d'engagement (Jamison et al., 1995). Il a même été montré qu'elles étaient essentielles à l'assemblage du complexe E (Staknis et Reed, 1995). Les protéines SR seraient donc très importantes dans l'épissage constitutif afin de définir les frontières de l'intron et de l'exon.

En plus de jouer ce rôle essentiel dans la régulation de l'épissage constitutif où l'ensemble des protéines SR auraient plutôt des fonctions redondantes (Mayeda et Krainer, 1992; Zahler et al., 1992), des fonctions plus spécifiques sont aussi associées à chacune d'entre elles pour la sélection des sites d'épissage alternatif. D'ailleurs, en accord avec cette proposition, le niveau d'expression de ces protéines peut varier d'un tissu à un autre (Hanamura et al., 1998; Zahler et al., 1992). De plus, les protéines SR sont généralement reconnues pour favoriser la sélection des sites d'épissage proximaux (Fu et al., 1992; Horowitz et Krainer, 1994; Krainer et al., 1990). Les protéines SR ont surtout été caractérisées comme étant des activateurs de l'épissage en liant des séquences riches en purines. En fait, les spécificités de liaison de plusieurs protéines SR ont été déterminées à l'aide de la procédure SELEX et certaines sont indiquées au Tableau 1 (revu dans (Graveley, 2000) (Cavaloc et al., 1999; Hanamura et al., 1998; Liu et al., 1998; Tacke et Manley, 1995)). Brièvement, la méthode SELEX permet de récupérer les séquences d'ARN qui possèdent le plus d'affinité pour une protéine donnée suite à quelques rondes de sélection réalisées *in vitro*.

**Tableau 1. Quelques séquences d'ARN identifiées comme sites de liaison pour les protéines SR par la procédure SELEX**

Protéine SR	Site de liaison SELEX	Référence
<b>ASF/SF2</b>	RGAAGAAC AGGACARRAGC GARGAGC	Tacke et Manley, 1995  Hanamura et al, 1995
	SRSASGA (SELEX fonctionnelle)	Liu et al, 1998
<b>SC35</b>	AGSAGAGTA GUUCGAGUA	Tacke et Manley, 1995
	GGGUAUGCUG AGGAGAU	Cavaloc et al, 1999
<b>SRp55</b>	USCGKM	Liu et al, 1998

R : A ou G    S : G ou C    K : U ou G    M : A ou C

\*Note : Ce tableau est adapté de Graveley, 2000.

Le premier exemple ayant montré le recrutement d'une protéine SR via un élément activateur a été pour l'exon alternatif EDIIIa du gène de fibronectine (Lavigne et al., 1993). Cet exon contient une séquence de neuf nucléotides qui recrute une protéine SR et favorise l'utilisation du site d'épissage 3' et ainsi l'inclusion de l'exon EDIIIa (Lavigne et al., 1993). En présence de cet élément, une augmentation de la liaison du snRNP U2 au site de branchement a aussi été observée (Lavigne et al., 1993). Par la suite, d'autres exemples ont montré que la présence de régions activatrices pouvant lier les protéines SR augmentait la liaison du facteur U2AF au site d'épissage 3' qui était situé en amont de la région activatrice (Staknis et Reed, 1995; Wang et Manley, 1995). Néanmoins, différents mécanismes de régulation par les protéines SR

sont possibles. En effet, il existe des exemples d'éléments activateurs liés par des protéines SR favorisant la sélection du site d'épissage 3' sans pour autant augmenter la liaison de U2AF (Kan et Green, 1999; Li et Blencowe, 1999). La liaison d'une protéine SR à une séquence activatrice peut inactiver un autre élément inhibiteur adjacent comme dans le cas de l'exon M2 du gène *IgM* (Kan et Green, 1999). Chew et ses collaborateurs montrent l'implication des protéines SR dans la stimulation de l'épissage pour des événements ayant lieu après la première étape de transestérification (Chew et al., 1999). D'autres chercheurs ont suggéré que la liaison de protéines SR à proximité d'un site d'épissage 5' pourrait favoriser l'utilisation de ce site en facilitant le recrutement du snRNP U1 (Bourgeois et al., 1999; Cote et al., 1999; Elrick et al., 1998; Eperon et al., 1993). Bien que la majorité des exemples caractérisés démontre un rôle activateur dans l'épissage pour les protéines SR, de plus en plus d'études montrent qu'elles peuvent aussi être associées à une répression de l'épissage. C'est notamment le cas de la liaison de protéines SR, tel ASF/SF2 et SRp30c, à un élément riche en purines retrouvé dans l'intron de l'unité d'épissage L1 d'adénovirus en amont de l'exon IIIa (Kanopka et al., 1996; Petersen-Mahrt et al., 1999). Dans cet exemple, la liaison d'une protéine SR à l'élément créerait un encombrement stérique qui empêcherait l'interaction du snRNP U2 et inhiberait ainsi l'utilisation de ce site d'épissage 3'. La protéine SRp38 a aussi été impliquée dans la régulation négative de l'épissage en phase M du cycle cellulaire et la déphosphorylation de SRp38 favorisait une interaction avec le snRNP U1. Cette interaction prévient alors la reconnaissance du site d'épissage 5' par le snRNP U1 (Shin et Manley, 2002). Un autre exemple de répression de l'épissage impliquant une

protéine SR est le cas de la protéine SRp30c qui, en liant l'élément CE9 dans l'intron du pré-ARNm de hnRNP A1, inhibe un site d'épissage 3' (Simard et Chabot, 2002). En effet, l'interaction de la protéine SRp30c à l'élément intronique CE9, situé en amont du site d'épissage 3' de l'exon 8 du pré-ARNm de hnRNP A1, entraîne une inhibition de ce site d'épissage 3' (Simard et Chabot, 2002). Par contre, le mécanisme d'action ne peut être dû à une interférence stérique tel que décrit pour le pré-ARNm IIIa d'adénovirus, puisque la liaison du snRNP U2 demeure inchangée (Simard et Chabot, 2000, 2002). Une description plus approfondie de la régulation de l'épissage du pré-ARNm de hnRNP A1 par les différents éléments qui sont caractérisés sera discutée un peu plus loin car ce sera le sujet d'étude de mon projet de recherche.

### **Les protéines hnRNPs**

La famille des protéines hnRNPs est composée d'une vingtaine de membres (Dreyfuss et al., 1993; Hassfeld et al., 1998) et leur spectre d'action étant varié, une attention particulière sera accordée uniquement à deux protéines de cette famille, les protéines hnRNP A1 et hnRNP I/PTB. Tout d'abord, les protéines hnRNPs sont généralement reconnues pour jouer un rôle antagoniste à l'activité activatrice des protéines SR dans la sélection des sites d'épissage alternatifs (Mayeda et Krainer, 1992; Mayeda et al., 1994; Yang et al., 1994). Il a cependant été montré que des protéines hnRNPs pouvaient être associées à des éléments activateurs pour favoriser l'inclusion d'un exon (Caputi et Zahler, 2002). Plus récemment un rôle générique dans l'épissage pour la définition des introns a été proposé pour les protéines hnRNP F/H et hnRNP A1

(Martinez-Contreras et al., 2006). Ainsi, bien que les protéines hnRNPs soient depuis longtemps considérées comme des répresseurs de l'épissage, elles peuvent aussi être impliquées dans l'activation de l'épissage.

### **La protéine hnRNP A1**

L'une des protéines les plus étudiées de la famille des hnRNPs est sans doute la protéine hnRNP A1. Cette dernière a une taille de 34 kDa et est composée de deux domaines de liaison à l'ARN ainsi que d'un domaine riche en glycine lui conférant la possibilité d'interagir avec des protéines possédant un domaine similaire (Buvoli et al., 1990c; Cartegni et al., 1996; Merrill et al., 1988). Krainer et ses collaborateurs ont montré l'importance de la protéine hnRNP A1 dans la sélection de sites d'épissage alternatifs. Lorsqu'un pré-ARNm constitué de deux sites d'épissage 5' en compétition pour un site d'épissage 3' est utilisé, contrairement aux protéines SR qui favorisent la sélection des sites proximaux, la protéine hnRNP A1 mène plutôt à l'utilisation des sites d'épissage distaux (Mayeda et Krainer, 1992; Mayeda et al., 1994). De plus, la variation de la quantité de protéines hnRNP A1 affecte la sélection des sites d'épissage 5' *in vivo* (Caceres et al., 1994; Yang et al., 1994). La protéine hnRNP A1 et ses homologues hnRNP A2 et hnRNP B1 peuvent aussi influencer négativement la sélection d'un site d'épissage 3' via une séquence exonique dans deux des gènes du virus VIH (Bilodeau et al., 2001; Caputi et al., 1999). Plusieurs pré-ARNs messagers possèdent aussi des sites de haute affinité pour la protéine hnRNP A1. La protéine hnRNP A1 peut d'ailleurs réguler l'épissage alternatif de son propre pré-ARNm via

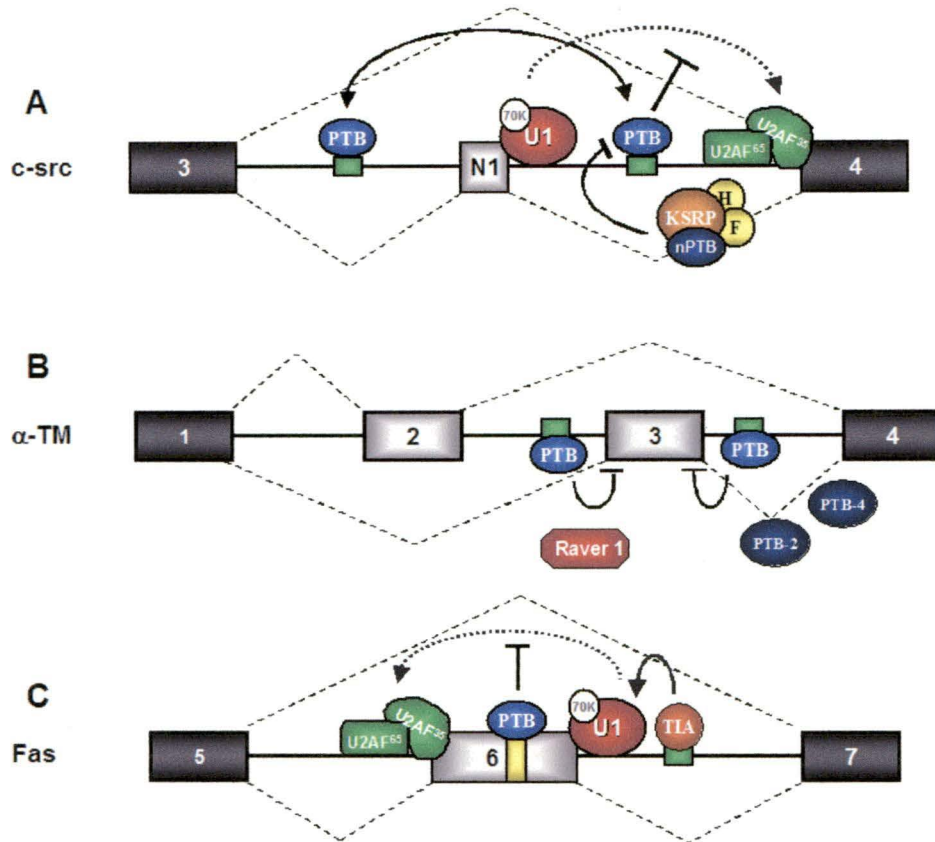
des sites de haute affinité pour hnRNP A1 contenus dans son pré-ARNm (Blanchette et Chabot, 1997, 1999; Chabot et al., 1997; Hutchison et al., 2002). Ce mode de régulation sera davantage discuté dans les sections suivantes. De nombreux exemples de régulation par la protéine hnRNP A1 ont été décrits. Afin d'en citer quelques uns, soulignons le cas de l'exon alternatif du gène *FGF-R2* (Del Gatto-Konczak et al., 2000), celui de l'exon du gène *tat* (Caputi et al., 1999) ou du gène *vpr* du virus du VIH (Bilodeau et al., 2001) ainsi que l'exemple de l'exon V6 du gène *CD44* (Konig et al., 1998; Matter et al., 2000). Outre ces fonctions dans l'épissage, la protéine hnRNP A1 est aussi impliquée dans le transport des ARN messagers (Izaurrealde et al., 1997; Michael et al., 1995) et peut affecter la biogénèse des télomères (LaBranche et al., 1998).

### **La protéine hnRNP I/PTB**

La protéine PTB (« polypyrimidine tract-binding protein »), aussi connue sous le nom de hnRNP I, fait une taille de 58 kDa et est composée de quatre domaines de liaison à l'ARN. Certains sites de liaison à l'ARN ont d'ailleurs été identifiés pour cette protéine et correspondent à UCUU (Perez et al., 1997b) ou encore à CUCUCU (Chan et Black, 1997). Ces sites se retrouvent parfois dans un contexte contenant davantage de pyrimidines (Oberstrass et al., 2005). Au départ, la protéine PTB était considérée comme un facteur d'épissage constitutif impliquée dans la reconnaissance du site d'épissage 3' puisqu'elle se retrouvait associée à la région riche en pyrimidines (« polypyrimidine tract ») à proximité du site d'épissage 3' (Garcia-Blanco et al.,



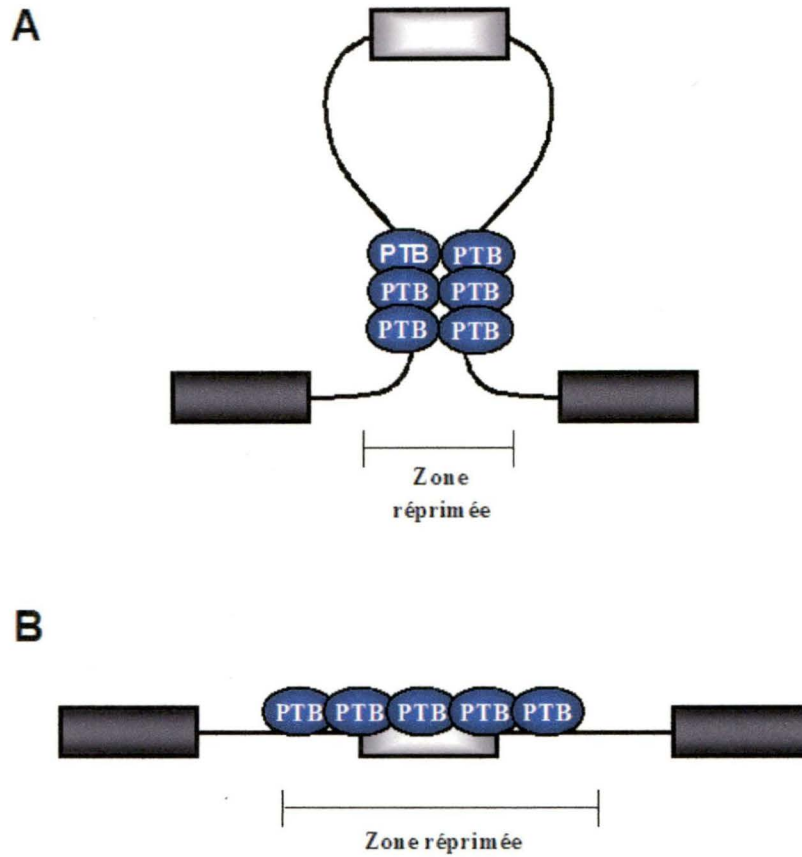
1989; Gil et al., 1991; Patton et al., 1991). Cependant, cette protéine est maintenant généralement reconnue comme étant un répresseur dans la régulation de l'épissage



**Schéma 6. Exemples de régulation de l'épissage alternatif par la protéine hnRNP I/PTB.** A. Dans la plupart des cellules, la liaison coopérative de PTB de part et d'autre de l'exon N1 de c-src réprime l'épissage de cet exon. Dans les cellules neuronales, la présence d'un complexe composé de KSRP, nPTB et hnRNP F/H déplace la liaison de PTB et permet l'inclusion de l'exon N1. B. Dans le pré-ARNm de  $\alpha$ -tropomyosine ( $\alpha$ -TM), l'exon 3 est inclus dans la plupart des cellules. Par contre, dans les cellules musculaires lisses cet exon est réprimé par la liaison de PTB de part et d'autre de l'exon 3. Le mode de régulation de PTB n'est pas encore connu, mais il a été observé que la présence des isoformes PTB-2 et PTB-4 en association avec la protéine Raver 1 augmentait cette répression. C. Modèle de régulation de PTB qui interférerait avec la définition de l'exon 6 du pré-ARNm de Fas. La protéine TIA-1 permet la définition de l'exon en favorisant la liaison du snRNP U1 au site 5' de l'exon 6 de Fas. suite à sa liaison à un ISE. La protéine PTB lie un ESS dans l'exon 6 de Fas et préviendrait la stimulation du snRNP U1 pour la liaison de U2AF<sup>65</sup> à la région riche en pyrimidines sans affecter la liaison du snRNP U1. Ce schéma est adapté de Izquierdo et al, 2005.

alternatif (revu dans (Valcarcel et Gebauer, 1997; Wagner et Garcia-Blanco, 2001). Le seul exemple de régulation positive par la protéine PTB jusqu'à présent caractérisé est celui du pré-ARNm Calcitonine/CGRP (Lou et al., 1999). Cependant, la régulation négative par PTB a été caractérisée pour de nombreux pré-ARNm modèles dont  $\alpha$ -actinine, GABA<sub>A</sub> $\gamma$ 2,  $\alpha$ -tropomyosine, c-src, Fas ainsi que plusieurs autres et les mécanismes de répression varient selon les exemples étudiés (Izquierdo et al., 2005; Wagner et Garcia-Blanco, 2001) (Schéma 6). Dans le cas du pré-ARNm GABA<sub>A</sub> (gène du récepteur à acide gamma-aminobutyrique de type A), la présence de plusieurs sites de liaison pour PTB à proximité du site de branchement et de la région riche en pyrimidines entraîne la répression de l'exon de 24 nucléotides en interférant avec la liaison de U2AF (Ashiya et Grabowski, 1997; Zhang et al., 1999). Dans plusieurs autres pré-ARNm modèles dont  $\alpha$ -tropomyosine, c-src et  $\alpha$ -actinine, les sites de liaison pour PTB n'interfèrent pas avec la liaison de U2AF. Par contre, des sites de liaison pour PTB sont disposés de chaque côté de l'exon alternatif et cela empêche l'inclusion de cet exon (Chan et Black, 1995, 1997; Chou et al., 1999; Gooding et al., 1994; Perez et al., 1997a) (schéma 6A et 6B). Puisqu'il a été démontré que la protéine hnRNP I/PTB pouvait interagir avec elle-même, un modèle d'interaction entre deux protéines PTB liées au pré-ARNm a été proposé (Chou et al., 2000). Conséquemment, cette interaction provoquerait un changement conformationnel du pré-ARNm et rapprocherait ainsi les sites d'épissage distaux (revu dans (Wagner et Garcia-Blanco, 2001) (schéma 7). Un modèle similaire de modulation de l'épissage par la protéine hnRNP A1 avait d'ailleurs été proposé par notre laboratoire pour la régulation de son propre pré-ARNm (Blanchette et Chabot,

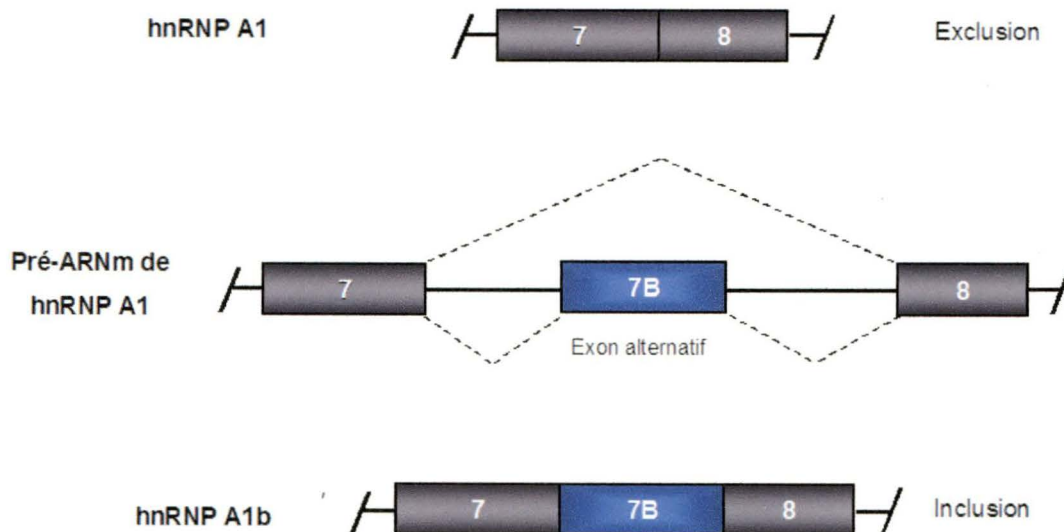
1999). La régulation de l'épissage alternatif du pré-ARNm de hnRNP A1 sera davantage élaborée dans la section qui suit.



**Schéma 7. Modèles proposés pour la régulation par la protéine hnRNP I/PTB.** **A.** Modèle du « looping out ». Des protéines PTB se lieraient de part et d'autre de l'exon alternatif pour ensuite interagir entre-elles. Cette interaction préviendrait ainsi l'inclusion de l'exon alternatif. **B.** Modèle de répression par la liaison de plusieurs protéines hnRNP I/PTB le long du pré-ARNm en empêchant ainsi les facteurs d'épissage de se lier à proximité de l'exon alternatif. Les zones d'épissage réprimées par les protéines PTB sont indiquées. Ce schéma est adapté de Wagner et Garcia-Blanco, 2001.

## La régulation du pré-ARN messager hnRNP A1

Tel que vu précédemment, la protéine hnRNP A1 joue un rôle important pour la modulation de l'épissage. Néanmoins, son propre pré-ARNm constitue aussi un modèle intéressant pour étudier l'épissage alternatif. En effet, le pré-ARNm de hnRNP A1 contient 11 exons dont l'exon 7B est épissé alternativement. L'exon alternatif 7B est situé entre l'exon 7 et 8 du pré-ARNm de hnRNP A1. L'inclusion de l'exon 7B entraîne la formation de l'isoforme A1b tandis que l'exclusion entraîne la formation de l'isoforme A1 (Buvoli et al., 1990a; Buvoli et al., 1990b) (Schéma 8). La fonction de chacun de ces isoformes demeure encore inconnue, mais le pré-ARNm de

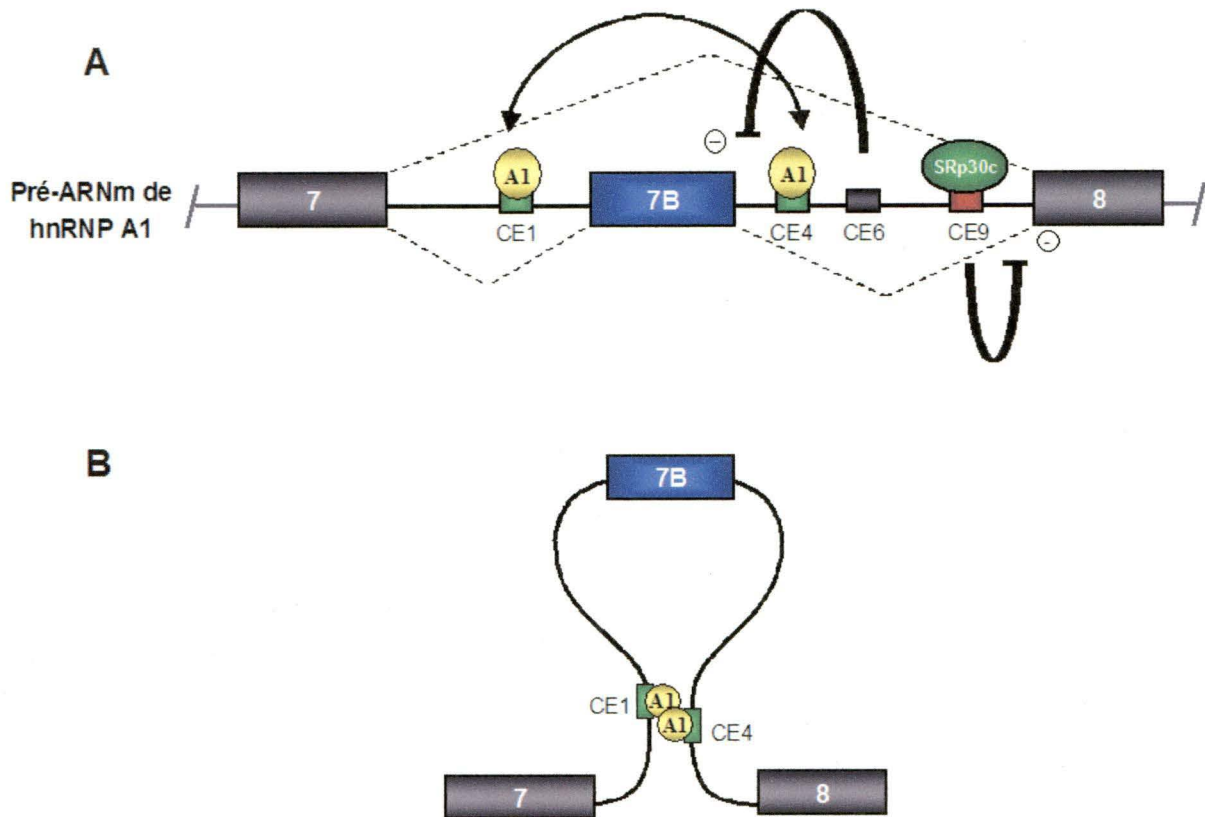


**Schéma 8. Représentation des isoformes produits par épissage alternatif à partir du pré-ARNm de hnRNP A1.** L'inclusion ou l'exclusion de l'exon 7B à partir du pré-ARNm de hnRNP A1 mène respectivement à la production des protéines hnRNP A1b et hnRNP A1.

hnRNP A1 est un modèle d'étude intéressant pour comprendre les mécanismes de contrôle de l'épissage alternatif. Une comparaison des séquences du pré-ARNm de hnRNP A1 entre l'humain et la souris ont révélé la présence d'éléments introniques conservés dans les régions à proximité de l'exon alternatif 7B. Parmi les dix éléments introniques conservés identifiés, les éléments CE1, CE4, CE6 et CE9 ont été caractérisés (revu dans Chabot et al., 2003) (Schéma 9A).

L'élément CE6 est constitué de 41 nucléotides et se retrouve en aval de l'exon 7B. La délétion de cet élément empêche presque complètement l'exclusion de l'exon 7B *in vivo* (Blanchette et Chabot, 1997). Il a été démontré que cet élément formait une structure secondaire avec le site d'épissage 5' de l'intron situé entre l'exon 7B et l'exon 8 qui prévenait la reconnaissance de ce site d'épissage par le snRNP U1 (Blanchette et Chabot, 1997). Les éléments CE1 et CE4 sont situés de part et d'autre de l'exon alternatif 7B et contiennent chacun un site de liaison pour la protéine hnRNP A1. Ainsi, il a été démontré que la protéine hnRNP A1 pouvait réguler l'épissage alternatif de son propre pré-ARNm (Blanchette et Chabot, 1997, 1999; Chabot et al., 1997; Hutchison et al., 2002). Le modèle suggéré pour expliquer l'exclusion de l'exon 7B par la liaison de protéines hnRNP A1 de chaque côté de l'exon 7B est celui du « looping out » (Blanchette et Chabot, 1999) (schéma 9B). Les protéines hnRNP A1 liant les éléments introniques CE1 et CE4 flanquant l'exon 7B pourraient interagir entre elles et ainsi rapprocher les sites d'épissage 5' de l'exon 7 et 3' de l'exon 8 pour favoriser l'exclusion de l'exon 7B (Blanchette et Chabot, 1999; Nasim et al., 2002). Plusieurs évidences sont d'ailleurs en accord avec ce modèle : la

possibilité des protéines hnRNP A1 d'interagir entre elles via leur domaine riche en



**Schéma 9. Régulation du pré-ARNm de hnRNP A1 par différents éléments introniques conservés.** A. Parmi les éléments identifiés, les éléments CE1, CE4, CE6 et CE9 ont été caractérisés. Tel que représenté, CE1 et CE4 peuvent être liés par les protéines hnRNP A1. CE6 forme une structure secondaire stable avec le site d'épissage 5' de l'exon 7B. CE9 réprime l'utilisation du site d'épissage 3' de l'exon 8 et la protéine SRp30c est importante pour cette inhibition. B. Le modèle du « looping out » a été proposé pour favoriser l'exclusion de l'exon 7B suite à la liaison des protéines hnRNP A1 de part et d'autre de l'exon alternatif. Les protéines hnRNP A1 interagiraient entre-elles et provoqueraient ainsi un changement de conformation du pré-ARNm qui rapprocherait les sites d'épissage distaux. Ce schéma est adapté de Chabot et al, 2003.

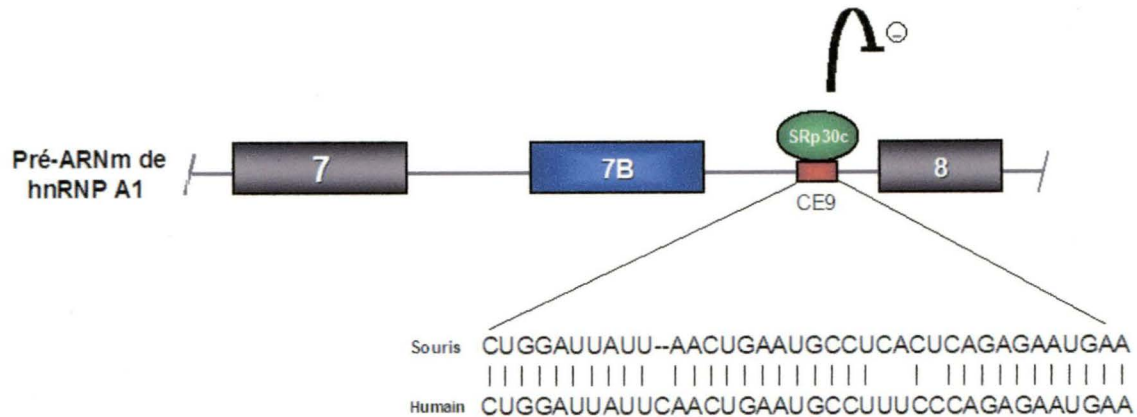


glycine (Blanchette et Chabot, 1999; Cartegni et al, 1996), l'éloignement des sites de liaison pour A1 de part et d'autre de l'exon alternatif provoque encore l'exclusion de l'exon 7B (Nasim et al., 2002) et le fait que l'insertion de séquences complémentaires de chaque côté de l'exon alternatif favorise l'épissage vers l'exclusion de l'exon 7B (Nasim et al., 2002) (revu dans (Chabot et al., 2003). De plus, ce mécanisme pourrait fournir une explication pour des événements d'épissage alternatif rencontrés dans d'autres systèmes. Tel qu'illustré dans la section précédente pour le cas de la protéine hnRNP I/PTB dans la modulation de plusieurs pré-ARNm modèles (revu dans (Wagner et Garcia-Blanco, 2001) (schémas 6 et 7).

#### **Le contrôle du pré-ARNm de hnRNP A1 par CE9 et la protéine SRp30c**

Les éléments CE1, CE4 et CE6 sont tous impliqués dans la régulation de l'épissage alternatif favorisant l'exclusion de l'exon 7B. Il était attendu que certains éléments conservés soient aussi impliqués dans la régulation favorisant l'inclusion de l'exon 7B. L'élément CE9, situé à 119 nt en amont de l'exon 8 et constitué de 38 nt, a la capacité de moduler l'épissage de cette manière et les résultats obtenus indiquent qu'il agit comme régulateur négatif du site d'épissage 3' de l'exon 8 (Simard et Chabot, 2000, 2002) (Schéma 10). En effet, la présence d'une seule copie de CE9 entre deux sites d'épissage 3' en compétition pour un site d'épissage 5' est suffisante pour stimuler l'épissage vers le site d'épissage 3' proximal (Simard et Chabot, 2000, 2002). Malgré qu'une seule copie de CE9 insérée dans l'intron d'un pré-ARNm contenant uniquement un intron a un faible effet sur l'épissage, l'insertion de deux ou trois

copies de cet élément entraîne une forte inhibition de l'épissage (Simard et Chabot, 2002).



**Schéma 10. Alignement de la séquence conservée de CE9 entre humain et souris.** L'élément CE9 est situé à 119 nucléotides du site d'épissage 3' de l'exon 8 et contient 38 nucléotides. L'alignement de la séquence CE9 entre l'humain et la souris démontre une homologie de plus de 90%. CE9 entraîne la répression du site d'épissage 3' de l'exon 8 et la protéine SRp30c est importante pour permettre cette activité.

De plus, plusieurs évidences suggéraient que l'activité de CE9 impliquait un facteur *trans* : CE9 avait des effets sur plusieurs substrats d'ARN, l'ajout d'un excès d'ARN compétiteur encodant pour CE9 rétablissait l'épissage d'un pré-ARNm affecté par l'élément CE9, et un complexe protéique spécifique était obtenu avec CE9 lorsque incubé en présence d'un extrait nucléaire (Simard et Chabot, 2002). Une chromatographie d'affinité effectuée à l'aide des 16 premiers nucléotides de la séquence CE9 a permis de récupérer une protéine par la suite identifiée par spectrométrie de masse. Cette protéine correspondait à un membre de la famille des protéines SR : SRp30c (Simard et Chabot, 2002). Plusieurs résultats corroboraient la contribution de cette protéine pour l'activité de l'élément CE9. Tout d'abord, SRp30c



pouvait interagir avec la séquence CE9 dans une expérience de gel de retardement. Deuxièmement, des mutations à l'intérieur de la séquence CE9 empêchant la liaison de SRp30c affectaient les profils d'épissage préalablement obtenus. Troisièmement, l'ajout de la protéine recombinante SRp30c dans une réaction d'épissage en présence d'un pré-ARNm contenant deux copies de CE9 accentuait spécifiquement l'activité de répression de CE9 (Simard et Chabot, 2002). L'action de SRp30c était d'autant plus spécifique que l'ajout d'une autre protéine SR, ASF/SF2, n'inhibait pas l'épissage. ASF/SF2 possède pourtant 75% de ses acides aminés identiques à ceux de la protéine SRp30c (Simard et Chabot, 2002). Lorsque les séquences en acides aminés de SRp30c et ASF/SF2 sont comparées, des différences importantes se situent dans les portions carboxy-terminales de ces protéines (le domaine SR) (Schéma 11). En effet, seulement cinq répétitions du dipeptide sérine-arginine sont présentes pour la protéine SRp30c, alors que douze répétitions se retrouvent chez la protéine ASF/SF2. Il est possible que ces différences influencent leur fonction puisqu'il a d'ailleurs été démontré que le potentiel d'activation de l'épissage pouvait varier selon la taille des domaines SR présents (Graveley et Maniatis, 1998). Il est à souligner que l'ajout de sites ayant une forte affinité de liaison pour ASF/SF2 à la même position que les éléments CE9 dans l'intron d'un pré-ARNm n'entraînait pas une inhibition de l'épissage (Simard et Chabot, 2002). L'ensemble de ces résultats indiquent clairement que la protéine SRp30c joue un rôle spécifique important dans l'activité inhibitrice de CE9, bien que la contribution de d'autres protéines ne soit pas exclue.



d'ailleurs le premier exemple démontrant la modulation impliquant un site d'épissage 3' commun et cette stratégie de régulation pourrait être tout aussi importante pour produire les isoformes requis dans les proportions adéquates selon les tissus cellulaires.

### **La régulation de l'épissage alternatif par la protéine SRp30c**

L'implication de la protéine SRp30c dans l'activité inhibitrice de CE9 pour la régulation du pré-ARNm de hnRNP A1 était la première fonction spécifique identifiée pour cette protéine (Simard et Chabot, 2002). Depuis, la protéine SRp30c a été associée à l'activité de nombreux éléments impliqués dans le contrôle de l'épissage alternatif. SRp30c favorise l'inclusion de l'exon 7 de SMN (« survival motor neuron ») à l'aide d'une interaction avec la protéine hTra2 $\beta$  (Young et al., 2002). De plus, une sur-expression de la protéine SRp30c favorise l'inclusion de l'exon alternatif 10 de tau et la protéine hTra2 $\beta$  peut aussi se lier à un élément activateur en stimulant l'inclusion de l'exon alternatif 10 de tau (Jiang et al., 2003; Kondo et al., 2004). Ces observations sont cependant en contradiction avec une étude plus récente qui indique que SRp30c serait plutôt impliquée dans l'inhibition de l'inclusion des exons alternatifs 2 et 10 de tau (Wang et al., 2005). Ces derniers résultats indiquaient la présence d'éléments répresseurs pouvant être liés par SRp30c et SRp55 aux extrémités 5' de chacun des exons alternatifs. De plus, ces mêmes auteurs suggéraient que SRp30c empêchait l'interaction de hTra2 $\beta$  à l'élément activateur puisque SRp30c pouvait interagir à la fois avec hTra2 $\beta$  et SRp55 (Wang et al., 2005). L'action de

SRp30c a aussi été démontrée pour l'épissage alternatif du pré-ARNm du récepteur aux glucocorticoïdes (Xu et al., 2003). À ces nombreux exemples s'ajoutent des études qui ont permis d'identifier des protéines pouvant interagir avec SRp30c, dont SAF-B, YB-1, rSLM-2, rSLM-1, Nop30 et E4-ORF4 (Nayler et al., 1998; Raffetseder et al., 2003; Stoss et al., 2004; Stoss et al., 2001; Stoss et al., 1999). Parmi ces protéines, plusieurs d'entre elles sont impliquées dans la modulation de l'épissage alternatif. En effet, SRp30c et YB-1 ont un impact sur l'épissage alternatif de E1A de l'adénovirus (Raffetseder et al., 2003). Les protéines rSLM-1 et rSLM-2 ont un impact sur l'exon alternatif v5 de CD44 (Stoss et al., 2004). La protéine d'adénovirus E4-ORF4 qui est une protéine activatrice de l'épissage interagit aussi avec la protéine SRp30c (Estmer Nilsson et al., 2001). L'activité de Nop30 est augmentée par une co-transfection avec la protéine SRp30c et Nop30 peut moduler l'épissage alternatif des gènes rapporteurs de preprotachykinine et de SRp20 (Stoss et al., 1999).

Ainsi, depuis l'implication de la protéine SRp30c dans la régulation de l'épissage alternatif du pré-ARNm de hnRNP A1 via l'élément CE9, plusieurs rôles spécifiques pour la protéine SRp30c ont été identifiés. Il semblait donc intéressant de caractériser davantage l'activité d'inhibition de la protéine SRp30c par l'élément CE9. La suite de cet ouvrage sera donc consacré à mieux comprendre le mécanisme de régulation du site d'épissage 3' commun, impliquant l'élément CE9 et la protéine SRp30c, du pré-ARNm de hnRNP A1.

Ainsi, l'identification d'un site de haute affinité pour la protéine SRp30c a d'abord été réalisée en utilisant la procédure SELEX et des mutations à l'intérieur de ce site ont aussi été effectuées afin de caractériser ce site de liaison. La présence de plusieurs sites de haute affinité pour SRp30c affecte l'épissage de la même manière que la séquence complète de CE9. Ces résultats confirment donc le rôle joué par SRp30c pour l'activité d'inhibition de CE9. Nous démontrons aussi l'implication de la portion 3' de CE9, en coopération avec la portion 5' préalablement caractérisée, pour favoriser la liaison de la protéine SRp30c. De plus, dans le but d'identifier un partenaire pour l'activité de SRp30c, nous avons isolé la protéine hnRNPI/PTB comme pouvant interagir avec CE9. Contrairement aux nombreux exemples de répression répertoriés pour la protéine PTB, nous démontrons un nouveau rôle pour cette protéine. En effet, dans notre système, la protéine PTB est un anti-répresseur de SRp30c et agit comme un antagoniste de l'action répressive de la protéine SRp30c via l'élément CE9.

## **Matériel et Méthodes**

### **Constructions plasmidiques pour réactions d'épissage**

Les constructions plasmidiques A3x, A2x, A2x $\alpha$ , A3xCE9.7 et C3'-/- ont été décrites précédemment (Simard et Chabot, 2000, 2002). Le plasmide AS21 a été construit en insérant l'oligo S21 hybridé au site StuI du plasmide pSPAdStu. Puisque l'oligo S21 contenait aussi un site EcoRV, cela permettait d'insérer plusieurs copies à la fois de cette même séquence; une, deux ou trois copies ont été insérées. Les plasmides C3'/1xS21, C3'-/2xS21, C3'-/3xS21 et C3'-/CE9 ont été construits en insérant les oligos S21 ou CE9, préalablement hybridés, au site EcoRV du plasmide C3'-/-. La même procédure a été utilisée pour le plasmide C3'/2xS21 $\alpha$  sauf que c'est la séquence complémentaire à S21 qui a été insérée.

### **Constructions plasmidiques pour protéines recombinantes**

Le plasmide pGEX-SRp30c encodant la protéine GST-SRp30c a été obtenu en faisant d'abord un RT-PCR à partir de cellules HeLa en utilisant les oligos SRp30c-1 et SRp30c-2. Le fragment PCR a ensuite été digéré par les enzymes EcoRI et XhoI pour ensuite être inséré dans le plasmide pGEX préalablement digéré par ces deux mêmes enzymes. Le plasmide pQE80L-SRp30c encodant la protéine His-SRp30c a été obtenu à partir du plasmide pGEX-SRp30c en le digérant par les enzymes BamHI et

HindIII. Le fragment obtenu a aussi été inséré aux sites BamHI-HindIII du vecteur pQE80L. La protéine His-SRp30c utilisée dans les réactions d'épissage a été obtenue par expression dans les cellules d'insectes infectées par un baculovirus recombinant. Le plasmide pVL1392-SRp30c a été obtenu en clonant le fragment SRp30c MfeI-ScaI de pQE80L-SRp30c aux sites EcoRI et SmaI du vecteur pVL1392 (BD Biosciences). pGEX-ASF/SF2 codant pour la protéine GST-ASF/SF2 a été obtenu en effectuant une réaction de RT-PCR à partir de cellules HeLa avec les oligos ASF/SF2-1 et ASF/SF2-B. Le fragment PCR a ensuite été digéré en utilisant les enzymes de restriction EcoRI-HindIII et inséré dans le plasmide pGEX préalablement digéré par ces mêmes enzymes. Le plasmide encodant la protéine His-hnRNP I/PTB a été gracieusement fourni par le Dr. Douglas L. Black (University of California, Los Angeles). La séquence encodant la protéine PTB était clonée dans le vecteur pET28a de la compagnie Novagen.

### **Séquences des oligonucléotides**

Les oligonucléotides ont été obtenus des compagnies Dharmacon Inc. (Lafayette, Co) et Integrated DNA technologies Inc. (Iowa). Ils ont été utilisés pour le clonage, comme substrats d'ARN pour les essais de gel à retardement et les essais de liaison par rétention sur colonne et comme compétiteur dans certaines réactions d'épissage.

### **Séquences des oligos d'ADN pour le clonage des constructions plasmidiques**

S21	ACAAAGGACGGCACAGGACA
S21-EcoRVsens	ACAAAGGACGGCACAGGACAGATATC *
S21-EcoRVcomp	<u>GATATCT</u> GTCTCTGTGCCGTCTTTGT *
CE9	CTGGATTATTCAACTGAATGCCTTTCCCAGAGAATGAA
CE9-EcoRVsens	CTGGATTATTCAACTGAATGCCTTTCCCAGAGAATGAAGATATC *
CE9-EcoRVcomp	<u>GATATCTT</u> CATTCTCTGGGAAAGGCATTTCAGTTGAATAATCGAC *

\* Note : La portion soulignée correspond aux nucléotides du palindrome de l'enzyme de restriction.

### **Séquences des oligos d'ARN pour réactions d'épissage ou gel à retardement**

CE9	<u>CUGGAUU</u> AUUAACUGAAUGCCUUUCCCAGAGAAUGAA *
CE9x (ou CE920)	CUGGAUUAUUAACUGAAUG
CE9y (ou CE910-25)	UCAACUGAAUGCCUU
CE9z (ou CE915d)	UUCCCAGAGAAUGAA
CE9-Pyless	CUGGAUUAUUAACUGAAUG                      AGAGAAUGAA
3XCE9.7	<u>CUGGAUU</u> AAGCUG <u>CUGGAUU</u> AAAGCUG <u>CUGGAUU</u> AAGGUG *
S21	ACCAAGGACGGCACAGGACA *
S21-CG	ACCAAGCAGGGCACAGGACA *
S21-GC	ACCAAGGACGGCACAGCACA *
S21-CC	ACCAAGCAGGGCACAGCACA *
S21-CCCC	ACCAACCACGGCACACCACA *



S21mod6                    ACCCCAGGACAUUUUAGGACA \*

S23                        CUCAGCCACAGUAGGACACA

\* Note : La portion soulignée correspond aux sept premiers nucléotides de la séquence CE9 ou au motif répété à l'intérieur de la séquence S21. Les nucléotides en bleu correspondent aux nucléotides mutés par rapport à la séquence S21.

### **Séquences des oligos pour les réactions de RT-PCR**

SRp30c-1 (EcoRI)                    TAGGAATTCTAATGTCGGGCTGGGCGGA

SRp30c-2 (Xho I)                    TACCGCTCGAGTCAGTAGGGCCTGAAAG

ASF/SF2-1 (EcoRI)                    TAGGAATTCTAATGTCGGGAGGTGGTGT

ASF/SF2-B (HindIII)                    TATCCCAAGCTTTTTATGTACGAGAGCGAG

\* Note : La portion soulignée correspond aux nucléotides du palindrome de l'enzyme de restriction.

### **Transcription *in vitro***

Pour les réactions de transcription *in vitro*, les pré-ARN messagers suivants A2x, A2x $\alpha$ , A3x, A3xCE9.7 et AS21 ont été obtenus en digérant préalablement les plasmides correspondants avec l'enzyme de restriction HincII. Toutes ces transcriptions ont été effectuées à l'aide de l'ARN polymérase SP6 (Amersham Biosciences). Les pré-ARN messagers C3'-/-, C3'-/1xS21, C3'/2xS21, C3'-/3xS21, C3'-/2xS21 $\alpha$  et C3'-/CE9 ont été obtenus en digérant préalablement chacun des plasmides respectifs avec l'enzyme ScaI et en effectuant la transcription avec l'ARN polymérase T3 (Amersham Biosciences). Toutes les réactions de transcription ont été

générées dans les conditions suivantes : 1 µg de plasmide linéarisé a été incubé dans un volume total de 6,75 µl contenant 1,25 µl de H<sub>2</sub>O, 1,25 µl de tampon SP6 5X (1M Tris-HCl pH 7,5, 1 M MgCl<sub>2</sub>, 1 M spermidine et 1 M DTT), 0,625 µl de rNTP (5 mM rATP, 5 mM rCTP et 1 mM rGTP), 0,625 µl d'UTP 100 mM, 1,25 µl de <sup>32</sup>P-UTP (800 Ci/mmol) (PerkinElmer Life Sciences), 0,25 µl de coiffe m<sup>7</sup>G(5')ppp(5')G (Amersham Biosciences), 10 unités de « RNAGuard » (40 U/µl ; Amersham Biosciences) et 10 unités d'ARN polymérase SP6 ou T3. Les réactions de transcription ont ensuite été incubées pendant 1h 30 à 37 °C et chargées sur un gel d'acrylamide dénaturant de 8 M urée. Les ARNs ont été purifiés selon la procédure décrite précédemment (Chabot, 1994) pour finalement être resuspendus dans l'eau et conservés à -80 °C.

### **Réaction d'épissage *in vitro***

Pour chacune des réactions d'épissage *in vitro*, environ 2 fmoles de transcrits ont été incubés dans une préparation d'extrait nucléaire de cellules HeLa (Dignam et al., 1983) à 30 °C pendant deux heures dans les conditions décrites précédemment (Chabot et al., 1997; Krainer et al., 1984). Les ARNs récupérés par extraction au phénol/chloroforme et précipitation à l'éthanol ont ensuite été séparés sur gel d'acrylamide dénaturant / 8M urée. Pour certaines réactions d'épissage, un oligo d'ARN compétiteur était ajouté en excès et celui-ci était préalablement incubé 10 minutes à 30 °C en présence de l'extrait nucléaire et du tampon d'épissage (1,4 mM rATP, 9 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM créatine phosphate, 7 % polyvinylalcool, 5,5 mM DTT,

10 unités RNAGuard (Amersham Biosciences)) avant l'ajout du pré-ARN messager radiomarké. Lorsque des protéines étaient ajoutées aux réactions d'épissage cette même procédure de pré-incubation de 10 minutes à 30 °C avec l'extrait nucléaire et le tampon précédait aussi l'incubation de deux heures avec le transcrit d'ARN radiomarké.

## **Production de protéines recombinantes**

Les protéines recombinantes utilisées pour les différentes expériences ont été produites en cellules d'insectes ou en bactéries.

### **Production de protéines recombinantes en cellules d'insectes**

Pour la production des protéines recombinantes, l'ADNc codant pour la protéine His-SRp30c a été inséré dans le vecteur pVL1392 aux sites EcoRI et Sma I. Cette protéine a été produite en utilisant le système d'expression par baculovirus (BD Biosciences), selon les instructions du manufacturier. La purification a été effectuée à l'aide de billes de  $\text{Ni}^{2+}$  (Ni-NTA Agarose, Qiagen). Les cellules d'insectes infectées par baculovirus ont été centrifugées et resuspendues dans une solution de 30 mM Tris-HCl (pH 8,0) et 0,5 mM NaCl. Les cellules ont été lysées par sonication dans le même tampon et le lysat (surnageant) a été incubé avec les billes de  $\text{Ni}^{2+}$  à 4 °C pendant 1h30 min. Les billes avaient été préalablement centrifugées et lavées deux fois avec le même tampon. Suite à l'incubation de 1h 30 min., trois lavages ont été effectués à

l'aide d'un tampon composé de 50 mM Tris-HCl (pH 8,0), 50 mM KCl, 20 mM MgCl<sub>2</sub> et 20 mM d'imidazole en incubant les billes sous agitation à 4 °C pendant cinq minutes pour chacun des lavages. Les protéines ont été éluées avec une solution de 30 mM Tris-HCl (pH 8,0), 0,5 mM NaCl et 500 mM imidazole sous agitation pendant 10 minutes et dialysées contre du tampon D (60 mM HEPES (pH 7,9), 100 mM KCl, 0,2 mM EDTA, 0,5 mM DTT et 20 % glycérol) pendant au moins six heures. La concentration des protéines a été évaluée par la technique de Bradford en utilisant le colorant « Bio-rad Protein Assay » (Bio-Rad) selon les indications de la compagnie.

### **Production de protéines recombinantes en bactéries**

Les plasmides pGEX-SRp30c et pGEX-ASF/SF2 encodant respectivement les protéines GST-SRp30c et GST-ASF/SF2 ont été transformés dans des bactéries *Escherichia coli* de type BL21. Une colonie de bactéries transformées a ensuite été piquée et mise en culture dans 15 ml de milieu LB contenant de l'ampicilline (0,1 mg/ml) à 37 °C pendant 16 heures avec agitation. 10 ml de la pré-culture ont été transférés dans 250 ml de LB ampicilline et la culture a été incubée à 37 °C jusqu'à une densité optique à 600 nm entre 0.8 et 1.0. Lorsque la croissance des bactéries avait atteint cette densité optique, l'induction pour la production de protéines était provoquée par l'ajout d'IPTG à une concentration finale de 100 µM suivie d'une incubation de quatre heures à 37 °C. La culture bactérienne a ensuite été centrifugée pendant 10 minutes à 3500 rpm et le culot a été rincé avec 25 ml de tampon Rec (50 mM piperazine-HCl pH 9,8, 500 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0,5 mM

PMSF, 1 mM benzamidine et 20 µg/ml de bacitracine). Une deuxième centrifugation de 10 min à 3500 rpm était alors effectuée et le culot était resuspendu dans 12,5 ml de tampon Rec. Ce mélange a ensuite été soniqué de deux à trois fois pendant 30 secondes et du Triton X-100 (concentration finale de 1%) était ajouté pour une incubation de 30 minutes à 4 °C. Cette solution était de nouveau centrifugée pendant 10 minutes à une vitesse de 10 000 rpm et le surnageant était transféré dans un autre tube. Ce surnageant a été utilisé pour la purification des protéines à l'aide de billes de glutathione-sepharose (Amersham Pharmacia Biotech) selon les recommandations de la compagnie. Suite à l'incubation des billes en présence du surnageant pendant 30 minutes à 4 °C, quatre lavages à l'aide du tampon Rec ont été effectués. L'élution des protéines purifiées a été effectuée avec le tampon d'élution contenant 200 mM piperazine-HCl pH 9,8, 500 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EDTA, 1 mM DTT et 20 mM glutathione réduite. Les protéines recombinantes obtenues ont été dialysées contre du tampon D et leur concentration évaluée selon la méthode de Bradford.

La protéine His-PTB encodée par le plasmide pET28a-PTB généreusement fourni par le Dr. Douglas L. Black a été purifiée selon la même procédure décrite pour la purification de la protéine His-SRp30c. Par contre, l'antibiotique utilisé était la kanamicine tel que décrit pour le plasmide pET28a (Novagen).

## **Gel de protéines**

Les gels de protéines ont été effectués en ajoutant d'abord du colorant de Laemmli 2X (10 % glycérol, 5%  $\beta$ -mercaptoéthanol, 2,3% SDS, 62,5 mM Tris-HCl (pH 6,8) et 0,1% bleu de bromophénol) à la quantité de protéine ou d'extrait nucléaire désiré. Les échantillons étaient ensuite chargés sur un gel d'acrylamide de 12 % (29 :1, acrylamide : bis-acrylamide) / SDS. Après la migration, les protéines étaient révélées en colorant au bleu de Coomassie ou encore au nitrate d'argent (pour la procédure de chromatographie d'affinité). Pour la coloration au bleu de Coomassie, le gel a été trempé pendant 20 minutes sous agitation dans une solution de bleu de Coomassie (0,1% Coomassie Brilliant R Blue, 45% méthanol, et 10% acide acétique). Le gel a par la suite été lavé quatre fois pendant 15 minutes dans une solution décolorante (10% méthanol et 10% acide acétique). Pour la coloration au nitrate d'argent, la procédure a été effectuée selon les recommandations de la compagnie (Amersham Biosciences).

## **Immunobuvardage de type Western**

Pour l'immunobuvardage de type Western, les protéines ont été préalablement migrées sur un gel d'acrylamide / SDS selon les instructions mentionnées ci-haut. Une fois que la migration était complétée, les protéines étaient transférées sur une membrane de nitrocellulose Hybond-C (Amersham Biosciences) à l'aide d'un tampon de transfert ( 3 g de Tris-HCl, 14 g de glycine, 250 ml de méthanol et le volume était

complété avec de l'eau pour atteindre 1 L au total) à 100 V pendant une heure. Une fois le transfert terminé, la membrane était incubée pendant au moins une heure dans une solution de TBST-5% lait (10mM tris-HCl, 150 mM NaCl, 0,1% Tween-20, 5 % de lait en poudre et pH ajusté à 7,6 avec HCl). La membrane était par la suite mise en présence de l'anticorps primaire anti-SRp30c dilué 1 : 1000 ou anti-PTB (fourni par le Dr Douglas L. Black) dilué 1 : 2000 dans du TBST-5% lait pendant 1 heure. La membrane a ensuite été lavée trois fois pendant 10 minutes au TBST (10 mM tris-HCl, 150 mM NaCl, 0,1 % Tween-20, pH ajusté à 7,6) et incubée pendant une heure avec l'anticorps secondaire anti-Ig de lapin couplé à la peroxydase (Amersham Biosciences) qui était dilué 1 : 5000 dans du TBST- 5% lait. La membrane a été de nouveau lavée trois fois au TBST et la révélation a été faite au ECL (Amersham Biosciences) selon les instructions de la compagnie.

## **SELEX**

Pour le protocole SELEX (« Systematic Evolution of Ligands by Exponential enrichment » ), la sélection *in vitro* des ARNs pour obtenir un site de liaison pour la protéine SRp30c a été effectuée en utilisant la protéine recombinante GST-SRp30c. La protéine a été immobilisée sur billes de glutathione-sepharose (Amersham Pharmacia Biotech) tel que décrit précédemment (Tacke et Manley, 1995). La séquence de l'oligonucléotide d'ADN dégénérée de départ SELN20 était la suivante : ATACCGTCGACCCGAGGGG N20 CCCGGTACCCAGCTTTTGTT. À l'aide des oligos SELREV (TTACTCGACAGGCGCGGATCCATACCGTCGACCTGGAGGGG) et SELT7

(TATCCG GAATTC TAATACGACTCACTATAG AACAAAAGCTGGGTACCGGG), un produit PCR a été obtenu et une réaction de transcription a été effectuée en utilisant l'ARN polymérase T7 (produite par Catherine Desrosiers, Université de Sherbrooke). Les conditions de transcription étaient les suivantes pour une réaction totale de 100 µl: 20 µl de tampon de transcription 5X, 20 µl d'HEPES 1M pH 7,4, 20 µl de NTP 100 mM, 1 µl de RNAGuard, 2 µl de T7 polymérase, 5 µl du produit PCR (préalablement digéré avec l'enzyme Bam HI) et 32 µl de H<sub>2</sub>O. Ce mélange d'ARN a ensuite été marqué en 5' à l'aide de [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] ATP selon la procédure décrite un peu plus loin. Le pool d'oligonucléotides d'ARN marqué ainsi obtenu a été mélangé aux billes de glutathione-sepharose où la protéine SRp30c avait été préalablement immobilisée. Ce mélange a été incubé sous agitation à 4 °C pendant 30 minutes dans un tampon de liaison (10mM HEPES pH 7,9, 100 mM KCl, 10% glycérol, 0.025% NP-40, 400 µg/ml de tRNA). Par la suite, des lavages successifs ont été effectués à l'aide de tampons contenant des concentrations croissantes de KCl et de tRNA. La concentration maximale utilisée était de 350 mM KCl et 800 µg/ml de tRNA. Des lavages étaient effectués jusqu'à ce qu'environ 10 % des oligonucléotides soient encore liés et les ARNs étaient ensuite récupérés par une extraction au phénol/chloroforme suivie d'une précipitation à l'éthanol. Une réaction de RT était ensuite effectuée en utilisant l'Omniscript (Qiagen) et l'amorce SELREV selon les recommandations du fabricant. La réaction de RT était incubée pendant une heure à 37 °C. Une réaction PCR était de nouveau effectuée, ce qui marquait le début d'une nouvelle ronde d'amplification. Au total, six rondes d'amplification ont ainsi été réalisées et les produits PCR qui ont été obtenus après la sixième ronde ont été clonés



dans le plasmide K<sup>+</sup> aux sites de restrictions EcoRI et BamHI pour finalement être séquencés.

### **Marquage des oligonucléotides**

Les oligos d'ARN pour effectuer les gels de retardement et les essais de liaison par rétention sur colonne ont été marqués à l'extrémité 5' à l'aide de [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] ATP. Les réactions ont été réalisées dans un volume de 10  $\mu$ l en utilisant 100 pmol d'oligonucléotides d'ARN, 1  $\mu$ l de tampon T4 PNK 10 X (New England Biolabs), 1  $\mu$ l de T4 polynucléotide kinase (10 unités /  $\mu$ l) (New England Biolabs) et 2,5  $\mu$ l de [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] ATP (3000 Ci / mmol) (PerkinElmer Life Sciences). Pour la procédure SELEX, 2,5  $\mu$ g d'ARN était utilisé pour le marquage et les réactions étaient effectuées dans un volume total de 25  $\mu$ l contenant : 2,5  $\mu$ l de tampon T4 PNK 10 X (New England Biolabs), 1  $\mu$ l de T4 polynucléotide kinase (10 unités /  $\mu$ l) (New England Biolabs) et 2,5  $\mu$ l de [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] ATP (3000 Ci / mmol) (PerkinElmer Life Sciences). Tous les échantillons étaient incubés pour une période de 45 minutes à 37°C. Les oligonucléotides d'ARN radiomarqués étaient ensuite purifiés à l'aide d'une colonne G-25 (Amersham Biosciences) selon les instructions du manufacturier.

### **Gel de retardement et essai de liaison par rétention sur colonne**

Pour les gels de retardement, les oligonucléotides d'ARN radiomarqués (5000 cpm / réaction) ont été incubés sur glace pendant cinq minutes dans 2,25  $\mu$ l de tampon

d'épissage ((1,4 mM rATP, 9 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM créatine phosphate, 7 % polyvinylalcool, 5,5 mM DTT, 10 unités RNAgard (Amersham Biosciences) ainsi qu'en présence ou non de 1,25, 2,50, 5, 10 et 15 µM de protéines recombinantes en complétant le volume avec 3,5 µl de tampon D. Par la suite, 1,75 µl de colorant contenant 1 mg/ml d'héparine a été ajouté aux réactions et les échantillons ont été chargés sur un gel d'acrylamide 5 % (29:1, acrylamide : bis-acrylamide). La migration a été effectuée dans un tampon de Tris-glycine (50 mM Tris-HCl et 50 mM de glycine). Pour les essais de liaison par rétention sur colonne, 5 µM de protéine SRp30c-GST ou His-PTB était utilisée et les conditions de liaison étaient les mêmes que celles décrites ci-haut. Par contre, au lieu d'ajouter le colorant et l'héparine pour la migration sur gel, 25 µl de billes de glutathione-sepharose (Amersham Pharmacia Biotech) ou de billes de Ni<sup>2+</sup> (Ni-NTA Agarose, Qiagen) était ajoutée. Des lavages à l'aide d'une solution contenant 50% de tampon D ainsi que des concentrations croissantes de sel (jusqu'à 350 mM NaCl) étaient ensuite effectués. Les comptes de radioactivité étaient effectués au départ ainsi qu'après chacun des lavages, ce qui permettait de déterminer le pourcentage d'ARN lié aux protéines après chacun des lavages.

### **Chromatographie d'affinité avec ARN**

La chromatographie d'affinité a été effectuée avec l'oligonucléotide d'ARN correspondant à la séquence complète de CE9. 25 nmol d'ARN a été incubé pendant une heure sur glace dans l'obscurité dans une réaction totale de 50 µl contenant 100

mM tris-HCl (pH 7,5) et 10 mM de sodium périodate. Par la suite, les oligos d'ARN ainsi traités au périodate ont été couplé à 0,25 ml de résine (« agarose adipic acid hydrazide resin ») selon les instructions de la compagnie (Amersham Biosciences). La résine a été lavée deux fois avec 10 ml de tampon de conservation (20 mM HEPES-KOH (pH7,9), 100 mM KCl, 20 % glycérol, 5,7 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT) et conservée à 4 °C dans le tampon de conservation. L'efficacité de couplage, qui était supérieure à 95%, a été évaluée en comparant la mesure d'absorbance à 260 nm de 1 % de la quantité traitée au périodate à 10% du matériel non-lié. 125 µl d'extrait nucléaire de cellules HeLa contenant 5,7 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,9 mM ATP, 36 mM créatine phosphate, 3,58 mM DTT et 1,25 unité/ml RNAGuard a été incubé en présence de 25 µl de billes compactées pendant 10 minutes à 30 °C en agitant à toutes les minutes. Le mélange a ensuite été centrifugé et les billes ont été lavées quatre fois avec 500 µl de tampon D. Les protéines liées aux billes ont été chargées sur gel d'acrylamide / SDS après que celles-ci aient été bouillies dans du colorant de Laemmli 2X (10 % glycérol, 5% β-mercaptoéthanol, 2,3% SDS, 62,5 mM tris-HCl (pH 6,8) et 0,1% bleu de bromophénol). Le gel d'acrylamide a ensuite été coloré au nitrate d'argent selon les recommandations de la compagnie.

### **Spectrométrie de masse**

Suite à la coloration au nitrate d'argent, les bandes obtenues pour la liaison potentielle à CE9 ont été digérées à la trypsine selon la procédure du laboratoire du Dr. Klaus Klarskov. Chacun de ces échantillons ont ensuite été analysés par spectrométrie de

masse (MALDI/MS) par le Dr. Klaus Klarskov. Les résultats obtenus auront permis d'identifier certaines protéines reconnues pour leur rôle dans la régulation de l'épissage.

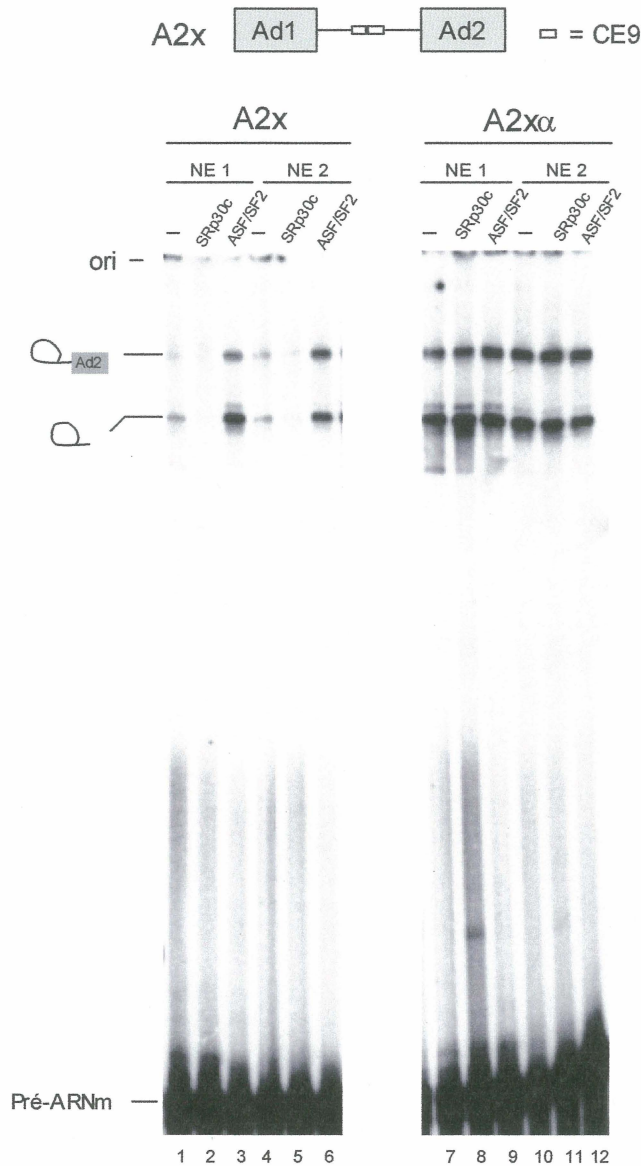
### **Pontage aux ultraviolets**

Les pontages aux ultraviolets ont été effectués à l'aide du « Stratalinker ». Environ 6 fmoles d'oligo d'ARN marqué uniformément au  $^{32}\text{P}$ -UTP ont été mises en présence de 12,5  $\mu\text{l}$  de mélange pour les réactions d'épissage incluant l'extrait nucléaire (voir conditions décrites dans la section réaction d'épissage *in vitro*). Ce mélange était ensuite soumis à des radiations aux ultraviolets pendant une minute et 30 secondes à une intensité de 500 mJoules. Par la suite, le mélange était incubé pendant 30 minutes avec la RNase A (concentration finale de 1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) et les protéines étaient séparées sur un gel de 12% acrylamide/SDS. Lorsque le pontage aux ultraviolets était réalisé avec des oligos d'ARN marqués uniquement en 5' à l'aide de  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}] \text{ATP}$ , aucun traitement à la RNase A n'était effectué.

## Résultats

### SRp30c et ASF/SF2 modulent l'activité de l'élément CE9

Un travail précédent réalisé par Martin Simard a montré que l'élément intronique CE9 de 38 nucléotides, favorise la sélection du site 3' en amont lorsque positionné entre deux sites d'épissage 3' (Simard et Chabot, 2000). CE9 agit en réprimant le site d'épissage 3' en aval puisque des éléments CE9 insérés dans un pré-ARNm contenant un seul intron inhibent l'épissage *in vitro* (Simard et Chabot, 2000, 2002). J'ai reproduit cette activité de répression en utilisant des préparations distinctes d'extraits nucléaires de cellules HeLa et un pré-ARNm modèle contenant deux copies introniques de CE9 (Figure 1, comparer les pistes 1 et 4 avec les pistes 7 et 10). La protéine SRp30c avait aussi été montrée importante dans l'activité de l'élément CE9 (Simard et Chabot, 2002). En effet, l'ajout de la protéine recombinante His-SRp30c à des réactions d'épissage *in vitro* inhibe l'épissage seulement en présence de l'élément CE9 (Figure 1, comparer les pistes 2 et 5 avec les pistes 8 et 11) (Simard et Chabot, 2002). Par contre, la protéine partageant le plus d'homologie avec SRp30c, soit la protéine ASF/SF2, stimule spécifiquement l'épissage en présence de l'élément CE9 (Figure 1, comparer les pistes 3 et 6 avec les pistes 9 et 12). Ainsi, l'activité de répression de SRp30c a été confirmée et ASF/SF2 pourrait jouer un rôle antagoniste en inhibant la contribution de SRp30c.



**Figure 1. SRp30c réprime l'épissage d'une façon dépendante de l'élément CE9, tandis qu'ASF/SF2 provoque l'effet inverse.** Les pré-ARNm A2x et A2x $\alpha$  ont été incubés avec deux préparations indépendantes d'extraits nucléaires (NE 1 et NE 2) de cellules HeLa (pistes 1-3, 7-9 pour le premier extrait nucléaire et pistes 4-6, 10-12 pour le second). A2x $\alpha$  est un contrôle et correspond au pré-ARNm A2x, mais avec les séquences complémentaires et inverses à CE9. Les extraits nucléaires sont préincubés pendant 10 min en présence des protéines (5  $\mu$ M de His-SRp30c ou GST-ASF/SF2) avant l'addition des transcrits radiomarqués. Les produits d'épissage ont été séparés sur un gel de 6,5% acrylamide/8 M urée. La position des pré-ARNm de même que des produits d'épissage est indiquée.

## **Identification d'un site de haute affinité pour SRp30c**

Afin de déterminer plus clairement le rôle de la protéine SRp30c dans l'activité de répression de CE9, l'utilisation de sites de liaison pour SRp30c autres que la séquence CE9 semblait une avenue intéressante à examiner. L'identification de nouveaux sites de liaison pour SRp30c a été effectuée à l'aide d'une procédure de sélection *in vitro* nommée SELEX avec la protéine recombinante GST-SRp30c et d'un mélange de séquences d'ARN contenant 20 nucléotides dégénérés. La procédure SELEX utilisée a été effectuée selon un protocole décrit précédemment (Tacke et Manley, 1995). La séquence initiale contenait 20 nucléotides dégénérés et des nucléotides fixes permettaient l'hybridation lors de l'amplification PCR et une séquence promotrice afin de permettre la liaison de l'ARN polymérase T7. Le mélange d'ARN contenant des nucléotides dégénérés était ensuite mis en présence de la protéine recombinante afin de sélectionner des ARNs pouvant lier la protéine. Plusieurs rondes d'amplification peuvent ainsi être effectuées afin de sélectionner des sites de haute affinité pour la protéine désirée. Après quatre rondes d'amplification, les ARNs liés aux protéines ont été récupérés, une réaction de transcription inverse a été effectuée suivie d'une amplification PCR et les produits obtenus ont finalement été clonés, puis séquencés. Parmi ces séquences, le motif ACCAC était fréquemment rencontré, mais puisqu'il n'était pas possible de trouver un consensus qui regroupait l'ensemble des séquences, nous avons poursuivi les rondes d'amplification. Après six rondes d'amplification, nous avons de nouveau récupéré les ARNs liés aux protéines et séquencé les clones obtenus. Parmi les 37 séquences analysées, suite à des clonages

indépendants, la séquence AGGAC était la plus fréquemment rencontrée et une séquence consensus émergeait ASSAS (S=G ou C) (Figure 2A). De plus, 22 clones possédaient au moins une copie de ce motif et cinq disposaient même de deux copies du motif. Dix autres clones présentaient une similarité presque parfaite avec la séquence ASSAS sauf pour un nucléotide qui ne correspondait pas à ce consensus (Figure 2A).

Par la suite, des oligos d'ARN dérivés des séquences obtenues par la procédure SELEX ont été utilisés pour réaliser des expériences de gel de retardement afin d'évaluer leur efficacité de liaison respective. L'ARN qui était lié le plus efficacement par GST-SRp30c contenait deux motifs AGGAC et portait le nom de SELEX 21 (S21) (Figure 2B, pistes 2 et 3). Un autre oligo d'ARN contenant une seule copie du motif AGGAC (S23 : CUCAGCCACAGUAGGACACA) était très faiblement lié par les protéines recombinantes SRp30c-His et SRp30c-GST (données non-montrées). Cependant, un nombre équivalent de molécules de SRp30c semblait lier S21 et S23 puisque les complexes S23/SRp30c et S21/SRp30c co-migraient (données non-montrées). Des résultats similaires ont été obtenus avec la protéine recombinante His-SRp30c (Figure 2B, pistes 4 et 5). Soulignons aussi que la protéine la plus apparentée à SRp30c, soit ASF/SF2, arrivait aussi à lier la séquence S21, mais avec une efficacité considérablement inférieure à SRp30c (Figure 2B, piste 6).



**A**

```

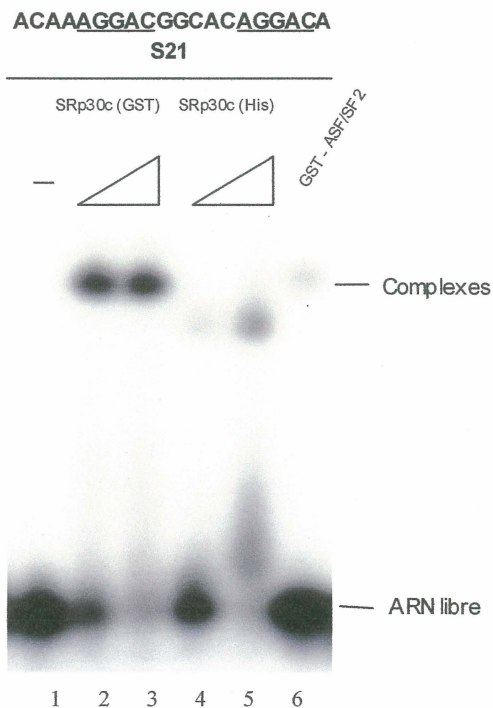
1  gcagcagccacacggagtggcccc
6  ggccgaatggaattaggacaacc
7  ggaataggacgcatgtatggcccc
9  ggcctaataaaagcaaggagtc
11 ggaggatgaaggaaaggacgccc
12 ggataggacgattggaggacgccc
13 ggaggaccagaatcaggagaagccc
14 gggtaaacacgctggaggagggccc
15 ggcagcaactgacgggctaagacccc
16 ggagaaggtcacacacaggacccc
17 ggccgaatggaattaggacaacc
18 gggcttagcagagtgacacacgccc
21 ggacaaaggacggcacaggacccc
23 ggctcagccacagtaggacacccc
25 ggataataggataaggaggaacccc
32 ggacaagacaggacagaagacccc
33 ggaagaggacaggacatagccc
34 ggactaccacctaaccacatagccc
37 ggctcagcgcagtaggagggccc
38 gggcgaaccgctagtgaacacccc
40 gggttggaagacggcgtaggagccc
42 ggaagagtagacggtaggagatccc

2  gggcaaggcaaggcagatacggccc
3  ggcataaacacatcaacggagccc
4  ggatggacacacaggcagggcacc
5  ggaacagcgcactaacaggacccc
8  ggtacagacagatcgtggatgacc
19 ggattcccacggacagagataacc
20 ggaacagaacgctcgtggacgccc
22 gggcagcgcagaaacaagtacc
24 ggacaatgtaaaacaggacccc
26 ggagccaacagctgaggatacacc
27 ggcacaaatcagatggaagaacccc
30 ggtagctccacgggtttaacgccc
35 gggcacacccgcaggaaagggccc
39 ggacaagacacacgggtctcgcgc
41 gggcattggacaatcacatggacc

```

A<sup>33</sup> T<sup>33</sup> A<sup>85</sup> G<sup>55</sup> A<sup>60</sup> A<sup>44</sup> C<sup>34</sup>  
 G<sup>33</sup> G<sup>26</sup> A<sup>85</sup> C<sup>15</sup> A<sup>45</sup> C<sup>30</sup> G<sup>34</sup>  
 T<sup>26</sup> C<sup>22</sup> A<sup>19</sup> A<sup>15</sup> C<sup>45</sup> G<sup>40</sup> G<sup>19</sup> A<sup>22</sup>  
 C<sup>8</sup> A<sup>19</sup> A<sup>15</sup> C<sup>45</sup> G<sup>40</sup> T<sup>7</sup> T<sup>10</sup>

**B**



**Figure 2. SRp30c lie fortement la séquence SELEX 21.** **A.** Suite à six rondes d'amplification SELEX, l'ARN lié a été récupéré, une réaction de transcription inverse effectuée ainsi qu'une amplification PCR et les produits ont été clonés puis séquencés. Les chiffres devant les séquences correspondent au numéro des clones séquencés. **B.** L'expérience de gel de retardement a été effectuée avec l'ARN SELEX 21 (S21) qui a été incubé pendant 10 min sur glace en présence d'héparine (1 mg/ml) ainsi que d'une concentration croissante de GST-SRp30c ou His-SRp30c (2,5  $\mu$ M ou 5  $\mu$ M) (respectivement pistes 2, 3, 4 et 5) et 5  $\mu$ M de GST-ASF/SF2 (piste 6). Les complexes ont été séparés sur un gel natif de 5 % acrylamide. La séquence S21, un ARN contenant 2 copies du motif AGGAC, était celle qui liait SRp30c avec la plus grande affinité. La protéine recombinante ASF/SF2 pouvait aussi lier S21, mais avec une affinité inférieure à la protéine recombinante SRp30c. La séquence S21 est indiquée avec les deux motifs AGGAC soulignée. La position de l'ARN libre ainsi que des complexes ARN/ protéine est aussi identifiée.

Par ailleurs, en changeant un seul motif AGGAC de la séquence S21 en AGCAC ou ACGAC, l'efficacité de liaison de SRp30c est fortement réduite (Figure 3, S21CG et S21GC). Lorsque les deux motifs sont convertis en AGCAC ou ACCAC, la formation des complexes est complètement abolie (Figure 3, S21CC ou S21CCCC). Par contre, la liaison de SRp3c n'est pas affectée par des mutations dans les nucléotides adjacents aux motifs AGGAC (Figure 3, S21mod6). Soulignons que les conditions dans lesquelles les séquences ont été récupérées par la procédure SELEX sont moins restrictives que les conditions du gel à retardement; ce qui pourrait expliquer pourquoi certaines séquences avaient été identifiées par SELEX, malgré que la liaison à SRp30c ne soit pas observée par gel de retardement. Ainsi, ces expériences de gel de retardement suggèrent que la présence de deux motifs AGGAC est essentielle pour assurer une liaison optimale de la protéine SRp30c.

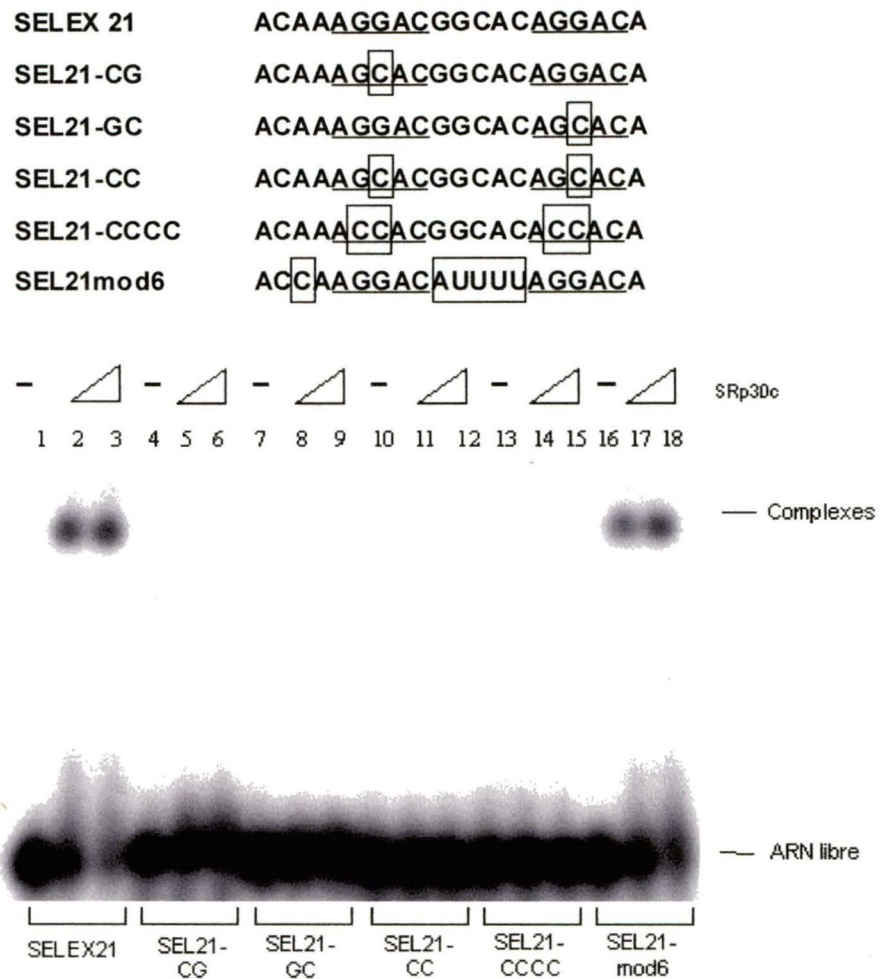
La liaison de la protéine SRp30c à S21 a ensuite été comparée avec la séquence CE9. Il est à noter que SRp30c avait été isolée par chromatographie d'affinité en utilisant une portion seulement de la séquence CE9 (16 premiers nucléotides) (Simard et Chabot, 2002). Les expériences de gel de retardement indiquent que SRp30c lie plus efficacement S21 que la séquence entière de CE9 (Figure 4A, comparer les pistes 13-16 avec les pistes 9-12). La force de liaison de SRp30c à S21 était comparable à celle observée avec un oligo contenant trois copies de CE9 (3XCE9) ou trois copies des sept premiers nucléotides de CE9 (3XCE9.7) (Figure 4A, pistes 1-4 et 5-8, respectivement). Trois copies de CE9 sont donc considérées comme étant équivalentes à une seule copie de S21 pour la liaison de la protéine SRp30c. La

liaison de ASF/SF2 à S21 et CE9 a aussi été comparée. Tel que montré à la figure 2B, ASF/SF2 ne lie pas S21 aussi efficacement que SRp30c (Figure 4B, comparer les pistes 4 et 5 avec les pistes 2 et 3). Par contre, aucune liaison de ASF/SF2 à 3XCE9 n'est détectable par gel à retardement (Figure 4B, pistes 9 et 10), ce qui confirme une observation antérieure (Simard et Chabot, 2002). Ces résultats suggèrent donc que S21 est un site de plus haute affinité pour SRp30c, alors que CE9 est un site plus spécifique pour SRp30c.

### **Plusieurs sites de liaison pour SRp30c reproduisent l'activité de CE9**

La séquence S21, déterminée par la procédure SELEX, a ensuite été testée dans des réactions d'épissage *in vitro* afin de vérifier sa capacité à moduler l'épissage. Nous savons qu'une copie de l'élément CE9 insérée entre deux sites d'épissage 3' dans le pré-ARNm C3'-/- mène à une diminution de l'utilisation du site d'épissage 3' distal au profit du site d'épissage 3' proximal (Simard et Chabot, 2002) (Figure 5A, comparer la piste 5 avec la piste 1). La présence d'une seule copie de S21 à la même position provoque aussi la sélection du site proximal, mais de manière beaucoup moins importante que CE9 (Figure 5A, piste 2). Deux copies de S21 augmentent l'utilisation du site 3' proximal, alors que deux copies complémentaires de S21 n'ont pas un effet aussi marqué (Figure 5A, comparer les pistes 3 et 6 respectivement). Finalement, l'insertion de trois copies de S21 affectent la sélection des sites d'épissage de manière équivalente à l'insertion de la séquence complète de CE9

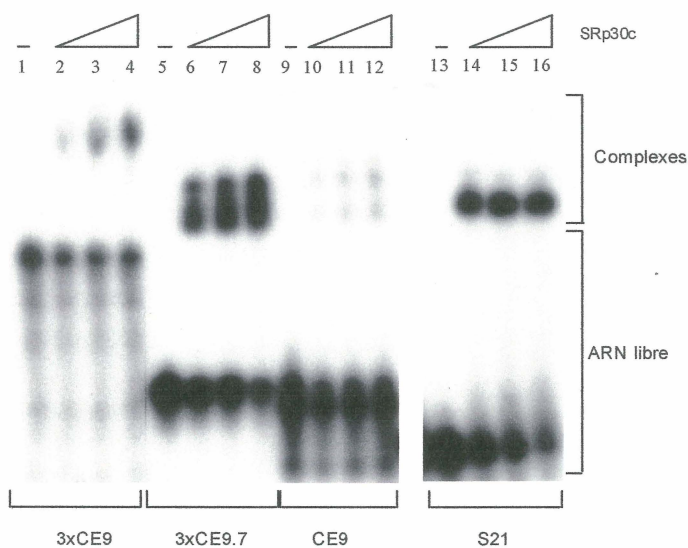
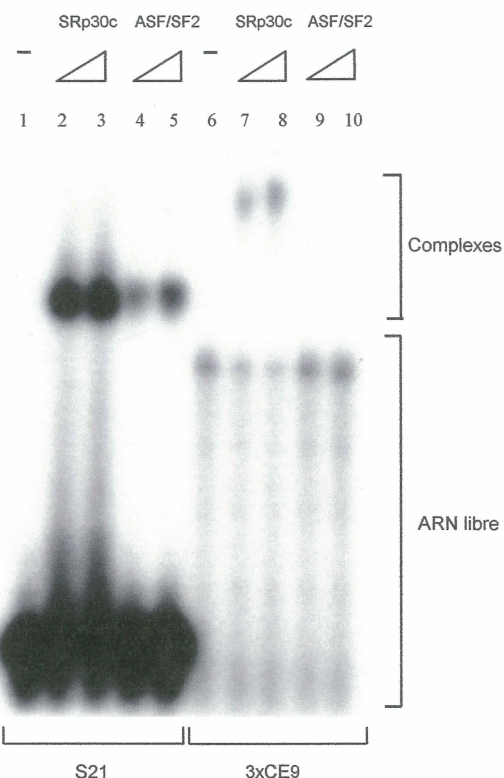
(Figure 5A, comparer la piste 4 avec la piste 5). Ainsi, ces résultats suggèrent que trois sites de liaison pour SRp30c sont nécessaires pour reproduire l'activité d'une seule copie de l'élément CE9 dans un essai où deux sites d'épissage 3' sont en compétition.



**Figure 3. Des mutations dans le motif AGGAC de S21 réduisent la liaison de SRp30c.** Les séquences de S21 ainsi que ses dérivés sont indiquées. Le motif AGGAC est souligné et les nucléotides mutés sont encadrés. Une expérience de gel de retardement a été effectuée en incubant les ARNs pendant 10 min sur glace en présence d'héparine (1 mg/ml) et d'une concentration croissante de protéine GST-SRp30c (2,5  $\mu$ M et 5  $\mu$ M). Les échantillons ont été fractionnés sur un gel natif de 5% acrylamide et les complexes ARN/protéine ainsi que l'ARN libre sont indiqués.

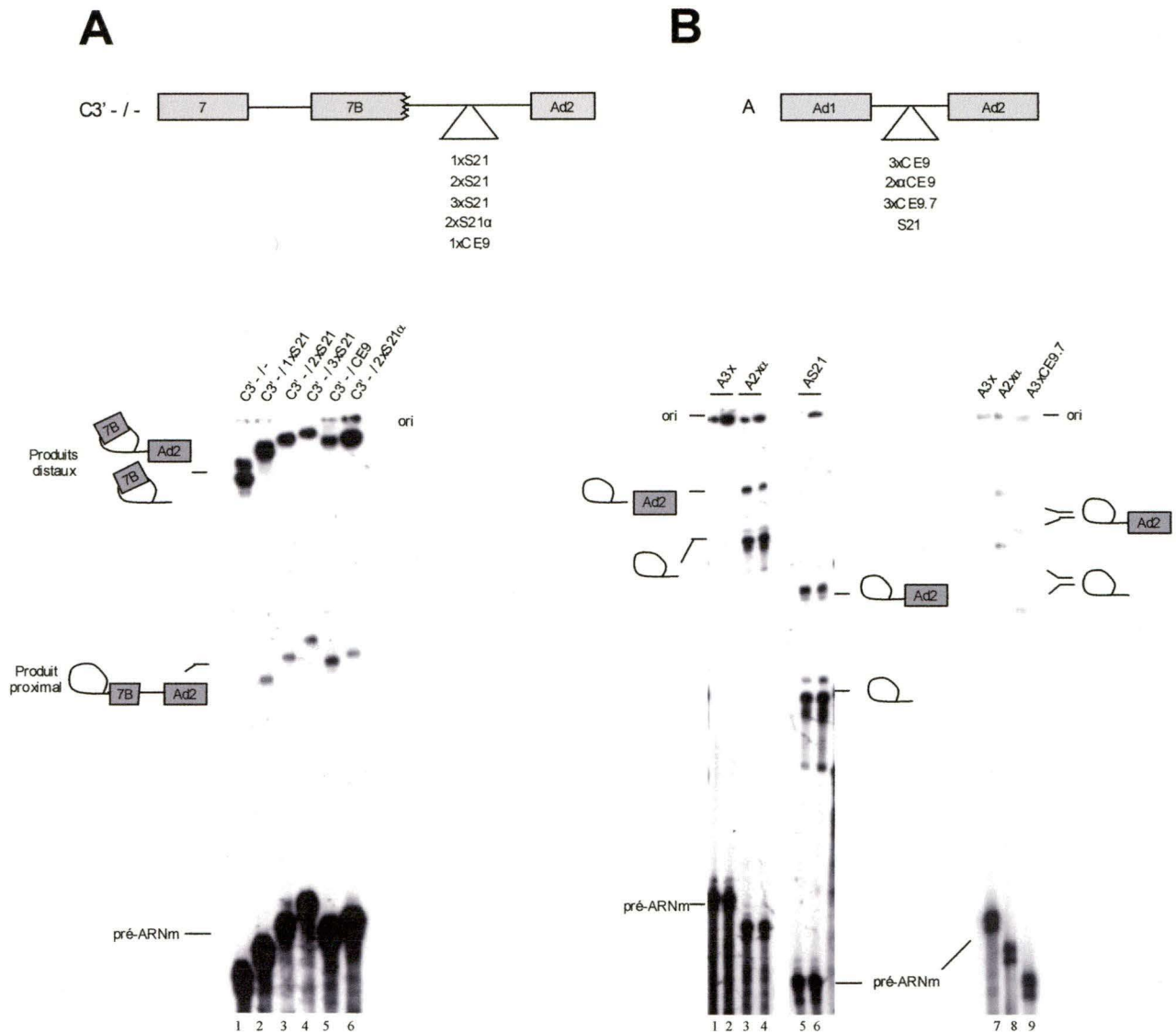
**A**

3xCE9.7 CUGGAUUAAAGCUGCUGGAUUAAAGCUGCUGAGUUAAGGUG  
 CE9 CUGGAUUAUUC AACUGAAUGCCUUUCCAGAGAAUGAA  
 S21 ACAAAGGACGGCACAGGACA

**B**

**Figure 4. SRp30c lie plus efficacement S21 que CE9.** **A.** Les séquences de S21 et de CE9 sont indiquées. Une expérience de gel de retardement a été effectuée en incubant les ARNs pendant 10 min sur glace en présence d'héparine (1 mg/ml) et d'une concentration croissante de protéine GST-SRp30c (1,25  $\mu$ M, 2,5  $\mu$ M et 5  $\mu$ M). Les échantillons ont été fractionnés sur un gel natif de 5% acrylamide et les complexes ARN/protéine ainsi que l'ARN libre sont indiqués. **B.** L'expérience de gel de retardement a été effectuée dans les mêmes conditions que celles mentionnées ci-haut. Par contre, les concentrations de protéines utilisées pour GST-SRp30c et GST-ASF/SF2 étaient de 2,5  $\mu$ M et 5  $\mu$ M. La différence dans l'intensité des ARNs libres peut être expliquée par le fait que S21 est un oligo marqué, alors que 3xCE9 est un transcrit d'ARN.





**Figure 5. Plusieurs copies de S21 sont nécessaires pour reproduire l'activité de répression de CE9 dans l'épissage.** Toutes les réactions d'épissage ont été effectuées à l'aide d'un extrait nucléaire de cellules HeLa. La position des pré-ARNm et des produits d'épissage est indiquée. **A.** Les produits d'épissage des réactions effectuées avec les constructions C3'-/- et leurs dérivées étaient séparés sur un gel de 11% acrylamide/8 M urée. C3'-/2xS21α est le pré-ARNm contrôle de C3-/2xS21 et contient donc les séquences de S21 complémentaires et inverses. Deux sites d'épissage 3' sont en compétition pour un site d'épissage 5' lors de ces essais. **B.** Les produits d'épissage des réactions de l'essai d'inhibition étaient migrés sur un gel de 6,5 % acrylamide/8 M urée.

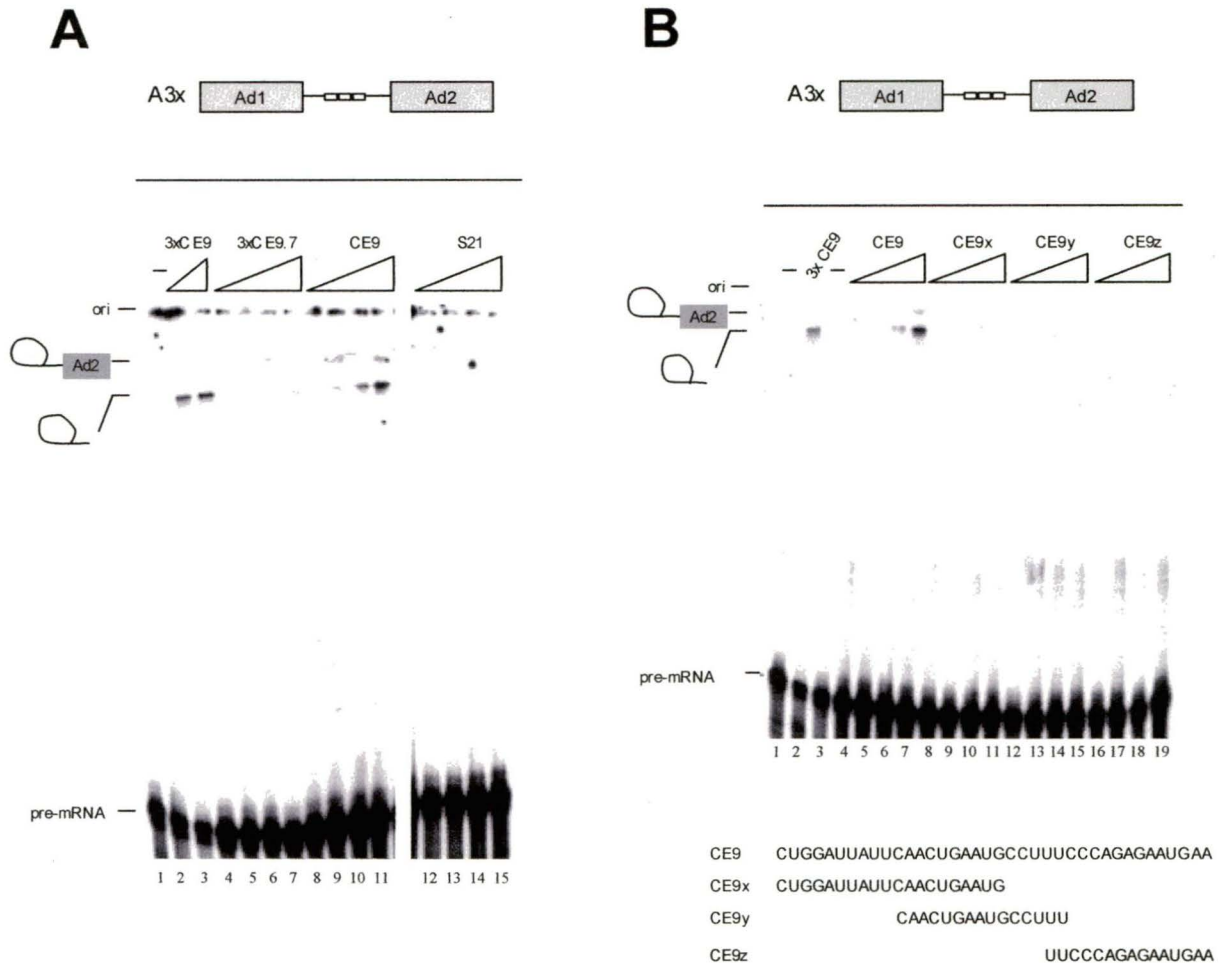
L'effet moins marqué de S21 dans l'épissage par rapport à CE9 a été confirmée dans un autre essai d'épissage en utilisant un pré-ARNm contenant un seul intron. Ainsi, des copies de CE9 ou S21 étaient insérées entre deux exons contenant des sites d'épissage provenant de l'adénovirus. Le pré-ARNm contenant trois copies introniques de CE9 (A3x) subit une inhibition presque complète de l'épissage, alors que le pré-ARNm contenant une seule copie de S21 n'est pas inhibée (Figure 5B, comparer les pistes 5 et 6 avec les pistes 1 et 2). De manière comparable, l'insertion de 3XCE9.7 (un autre site de liaison efficace pour SRp30c) ne provoque qu'une très faible inhibition de l'épissage. Étant donné que S21, 3XCE9 ainsi que 3XCE9.7 sont tous fortement liés par la protéine recombinante GST-SRp30c (Figure 4A), nos résultats indiquent que ces éléments liés par SRp30c ont des activités de répression distinctes dans l'épissage. Ces différences pourraient être expliquées si des facteurs empêchent la liaison de SRp30c à S21. ASF/SF2 possède d'ailleurs une certaine affinité pour S21 (Figure 4B) et cette protéine pourrait jouer un rôle antagoniste à l'activité de SRp30c dans l'épissage. Néanmoins, l'oligo 3XCE9.7 qui n'est pas lié efficacement par ASF/SF2 est aussi beaucoup moins actif que 3XCE9 pour réprimer l'épissage. Ces résultats suggèrent donc la contribution d'une autre portion de CE9, en plus de la partie 5' déjà caractérisée. Cette portion pourrait être liée par d'autres facteurs qui stabiliseraient la liaison de SRp30c à CE9.

Par ailleurs, des conclusions similaires ont été obtenues en effectuant des expériences où un excès d'ARN compétiteur était utilisé pour renverser l'inhibition de l'épissage d'un pré-ARNm contenant trois copies de CE9 (A3x). L'ajout d'un excès de l'ARN

CE9 ou de 3XCE9 renverse l'inhibition de l'épissage du pré-ARNm A3x (Figure 6A, pistes 8-11 et pistes 2-3, respectivement). Par contre, les oligos d'ARN compétiteurs S21 et 3XCE9.7 renverse faiblement l'inhibition de l'épissage de A3x (Figure 6A, pistes 12-15 et pistes 4-7, respectivement). Aucun des ARN compétiteurs utilisés n'affectaient l'épissage d'un pré-ARNm contrôle contenant deux copies complémentaires de CE9 (A2x $\alpha$ ) (données non-montrées). Ces résultats suggèrent donc que d'autres portions de CE9 pourraient permettre une liaison de SRp30c plus stable ou plus spécifique. D'autres facteurs interagissant avec CE9 pourraient aussi réguler l'activité de cet élément dans l'épissage. La région exacte permettant une meilleure activité demeure incertaine puisque des parties seulement de l'élément CE9 utilisés comme ARN compétiteur (CE9x, CE9y, CE9z) n'arrivent pas à renverser l'effet inhibiteur du pré-ARNm A3x (Figure 6B). La séquence complète de CE9 semble donc nécessaire pour renverser l'inhibition de l'épissage. Ainsi, d'autres portions de CE9 semblent importantes et pourraient faciliter la liaison de SRp30c. L'interaction d'autres facteurs qui permettraient l'activité de répression optimale de CE9 est aussi possible. En accord avec la première proposition, les 11 derniers nucléotides de la portion 3' de CE9 ont déjà montré une certaine activité d'inhibition dans l'épissage (Simard et Chabot, 2000). Bien qu'aucun essai de liaison n'ait montré la liaison directe de SRp30c à la portion 3' seulement de CE9 (données non-montrées), la séquence AGAAU y ait présente et a précédemment été associée à la liaison de SRp30c (Wang et al., 2005). Afin de déterminer si SRp30c interagit avec cette section de CE9, des essais de liaison par rétention sur colonne ont été réalisés avec la protéine GST-SRp30c. Pour cette expérience, nous avons utilisés quelques



oligonucléotides marqués ainsi que des billes de glutathione-sepharose. Suite à des lavages, le nombre de cpm retenu a été mesuré et un graphique indiquant le



**Figure 6. La séquence complète de CE9 permet de renverser l'inhibition de l'épissage plus efficacement que les autres ARNs compétiteurs utilisés lors d'un essai de compétition.** Toutes les réactions d'épissage ont été effectuées à l'aide d'extraits nucléaires de cellules HeLa en préincubant les ARNs compétiteurs 10 min à 30 °C avant l'ajout du pré-ARNm radiomarqué. La position des pré-ARNm de même que des produits d'épissage est indiquée. Les produits d'épissage étaient séparés sur un gel de 6,5% acrylamide/8 M urée. **A.** Les séquences des oligos d'ARN sont les mêmes que celles indiquées précédemment. Des excès de 250 et 500 fois ont été utilisés pour 3xCE9 tandis que des excès de 5000, 10 000, 25 000 et 50 000 ont été utilisés pour tous les autres oligos. **B.** La séquence des oligos d'ARNs compétiteurs utilisés est indiquée et les excès d'oligos sont les mêmes qu'en A, sauf que pour 3XCE9, un excès de 500 fois seulement a été utilisé.

pourcentage d'ARN lié est montré à la figure 8A. Dans ces conditions, la protéine SRp30c lie CE9 et S21 avec une affinité comparable. L'oligo d'ARN contenant les 29 premiers nucléotides de CE9 (CE9-29) est lié plus faiblement que la séquence complète de CE9. De plus, un oligo contenant les premiers 20 nucléotides de CE9 suivis des derniers 10 nucléotides (CE9-Pyless) était lié par SRp30c de façon équivalente à l'élément CE9 complet. Ces résultats indiquent une contribution de la partie 3' de CE9 dans la liaison de SRp30c et supportent la première proposition, soit que SRp30c lie deux régions distinctes de CE9.

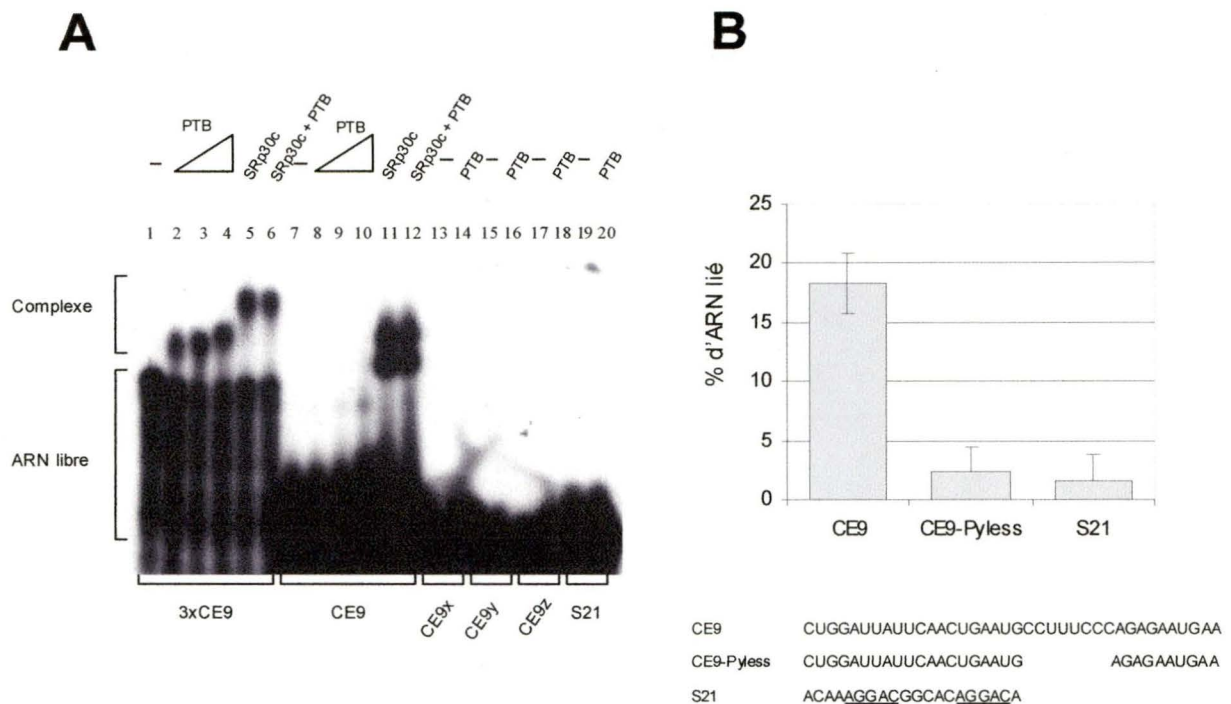
### **PTB antagonise l'activité de répression de SRp30c**

SRp30c a été récupérée, à partir d'un extrait nucléaire de cellules HeLa, par chromatographie d'affinité en utilisant les 16 premiers nucléotides de CE9 (Simard et Chabot, 2002). Dans un essai de pontage aux ultraviolets effectué avec la séquence complète de CE9, il est possible de mettre en évidence une protéine de la taille de SRp30c ainsi que deux autres protéines d'approximativement 50 kDa et 65 kDa (Simard et Chabot, 2002). Ainsi, afin d'identifier des protéines additionnelles qui pourraient être impliquées dans l'activité de CE9, une chromatographie d'affinité a été réalisée avec la séquence d'ARN complète de CE9 (38 nucléotides). Un extrait nucléaire de cellules HeLa a été chargé sur une colonne contenant l'ARN CE9 préalablement fixé. Des lavages successifs avec une solution contenant 100 mM KCl ont suivis et une élution finale a été effectuée à l'aide d'une solution contenant 600 mM de KCl. Les protéines éluées ont été séparées sur un gel d'acrylamide/SDS et

celui-ci coloré au nitrate d'argent. Les bandes ont ensuite été coupées et envoyées pour une analyse de spectrométrie de masse MALDI-MS (laboratoire du Dr. Klaus Klarskov, Université de Sherbrooke). Une des composantes identifiées avec un haut niveau de confiance était la protéine hnRNP I/PTB. En effet, sept peptides ont été identifiés pour avoir une forte homologie en acides aminés avec cette protéine ( $p < 0,05$ ).

Une expérience de gel de retardement avec la protéine recombinante His-PTB et des ARNs contenant la séquence CE9 a ensuite montré l'interaction de PTB avec CE9 (Figure 7A). PTB interagit faiblement avec CE9, mais lie davantage la séquence 3XCE9 (Figure 7A, pistes 7-10 et pistes 1-4 respectivement). PTB ne lie pas la séquence contrôle S21, pas plus que des portions de CE9 (CE9x, CE9y, CE9z) (Figure 7A, pistes 13-20). Le site de liaison pour PTB pourrait être situé dans la portion riche en pyrimidines de CE9 (CCUUUCCC) qui est d'ailleurs absente dans l'oligo CE9x et interrompue dans les oligos CE9y et CE9z. PTB et SRp30c lient 3XCE9 de manière comparable, mais la liaison de SRp30c à une seule copie de CE9 est supérieure à l'efficacité de liaison de PTB (Figure 7A, comparer la piste 10 avec la piste 11). Il est possible que plusieurs copies de CE9 stabilisent la liaison de PTB. De plus, lorsque les protéines recombinantes His-PTB et GST-SRp30c sont ajoutées simultanément, SRp30c lie plus efficacement CE9 et 3XCE9 que PTB. En effet, les complexes ARN-protéine formés lorsque les deux protéines sont présentes co-migrent avec le complexe formé par l'ajout de SRp30c seulement (Figure 7A, piste 12). Étant donné la faible liaison de PTB à CE9 par gel à retardement, nous avons confirmé la

liaison de PTB à CE9 dans un essai de liaison par rétention sur colonne. La protéine PTB a été incubée en présence des oligonucléotides marqués ainsi que des billes de  $\text{Ni}^{2+}$  et des lavages à des concentrations croissantes de sel ont suivis. Le pourcentage d'ARN lié a ensuite été déterminé (Figure 7B). Les résultats confirment la liaison de



**Figure 7. La protéine hnRNP I/PTB interagit avec la séquence CE9. A.** Les séquences S21, CE9 et leurs dérivées sont les mêmes que celles mentionnées précédemment. L'expérience de gel de retardement a été effectuée en incubant les ARNs pendant 10 min sur glace en présence d'héparine (1 mg/ml) et de protéines recombinantes. Une concentration croissante de protéine His-PTB (5  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$  et 15  $\mu\text{M}$ ) a été utilisée avec les ARNs 3XCE9 et CE9 (pistes 2, 3, 4, 8, 9, et 10), 10  $\mu\text{M}$  de GST-SRp30c (pistes 5 et 11) et un mélange de 10  $\mu\text{M}$  GST-SRp30c ainsi que de 10  $\mu\text{M}$  His-PTB (pistes 6 et 12) ont aussi été utilisés avec ces ARNs. Pour les ARNs CE9x, CE9y, CE9z et S21, 15  $\mu\text{M}$  de His-PTB a été ajoutée (pistes 14, 16, 18 et 20). Les échantillons ont été migrés sur un gel natif de 5% acrylamide et les complexes ARN/protéine ainsi que l'ARN libre sont indiqués. **B.** La liaison de PTB à CE9 a aussi été confirmée dans un essai de liaison par rétention sur colonne. 5  $\mu\text{M}$  de His-PTB a été utilisée et des lavages ont été effectués jusqu'à 50mM NaCl dans du tampon D. Les comptes de radioactivité étaient faits au départ ainsi qu'après chaque lavage ce qui a permis de déterminer le pourcentage d'ARN lié aux protéines. Le graphique représente donc le pourcentage d'ARN demeurant lié après les lavages à 50 mM NaCl et le tampon D pour les ARNs CE9, CE9-Pyless et S21 et l'écart type est aussi indiquée puisque les essais ont été effectués en triplicata.

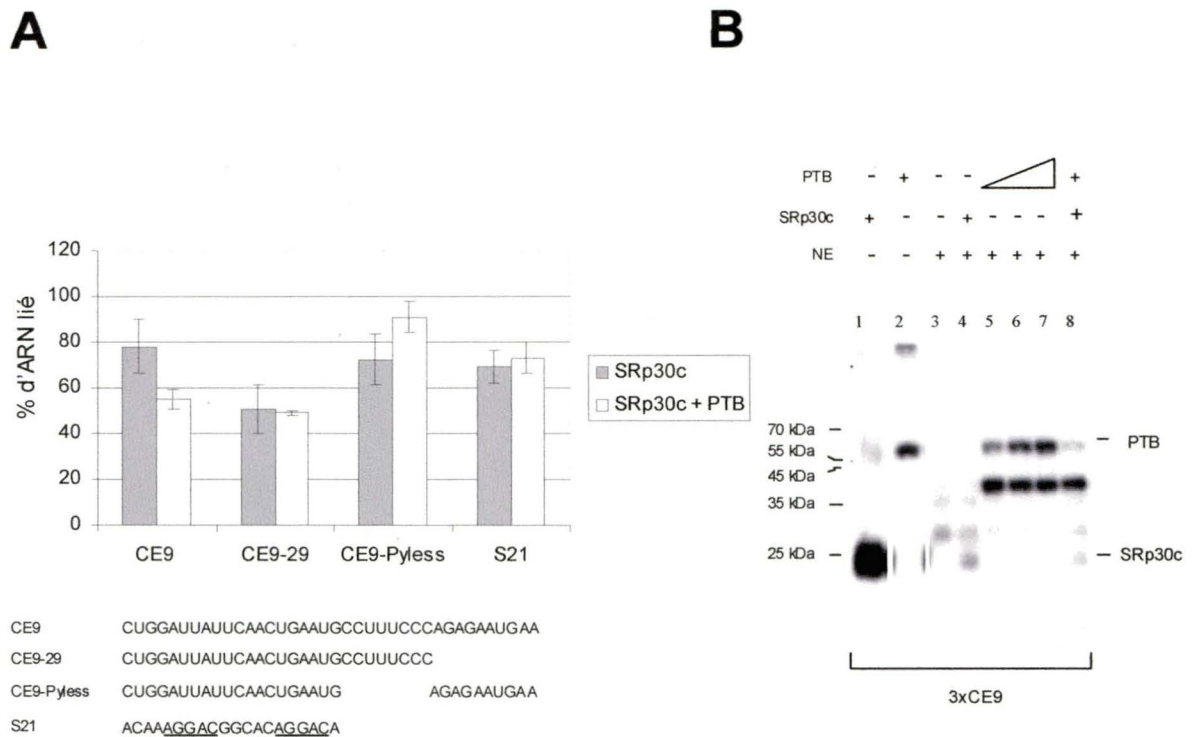
His-PTB à CE9, alors que l'interaction est à peine détectable pour l'oligo témoin S21 ainsi que pour l'oligo CE9-Pyless ne contenant pas le site potentiel de liaison pour PTB (CCUUUCCCC) (Figure 7B). Ces observations suggèrent que His-PTB peut lier CE9 et que la séquence CCUUUCCCC est importante pour cette liaison.

L'effet de PTB sur la liaison de SRp30c à CE9 a aussi été testé (Figure 8A) dans un essai de liaison par rétention sur colonne. Des billes de glutathione-sepharose ont été utilisées afin de récupérer la protéine GST-SRp30c avec les oligos d'ARN liés à celle-ci. L'ajout de PTB à la protéine SRp30c diminue la liaison de cette dernière à CE9. Cette diminution de liaison n'est pas observée pour l'oligo CE9-Pyless (dans laquelle la séquence CCUUUCCCC est absente), pas plus que pour l'oligo CE9-29 (incluant la séquence riche en CU) (Figure 8A). PTB n'a pas d'effet sur la liaison de SRp30c à l'oligo témoin S21. Ces résultats suggèrent que PTB compromet la liaison de SRp30c à la portion 3' de CE9 et que cet effet nécessite la présence de la séquence CCUUUCCCC.

Par la suite, l'interaction des protéines recombinantes His-PTB et His-SRp30c avec CE9 dans le contexte d'un extrait nucléaire a été testée par une expérience de pontage aux ultraviolets (Figure 8B). Dans ces conditions, la liaison de PTB à 3XCE9 est détectable (Figure 8B, comparer la piste 1 avec la piste 5). Contrairement à la protéine PTB, la liaison de SRp30c à 3XCE9 diminue considérablement lorsque l'extrait nucléaire est ajouté (Figure 8B, comparer la piste 2 avec la piste 4). En présence de quantités équivalentes de PTB et SRp30c ajoutées simultanément, SRp30c semble



déplacer la liaison de PTB davantage que l'inverse (Figure 8B, comparer les pistes 4 et 5 avec la piste 8). Ces résultats confirment la plus grande affinité de la protéine recombinante SRp30c pour CE9 par rapport à PTB dans un extrait nucléaire. Soulignons aussi que l'ajout de PTB semble promouvoir la liaison d'une protéine

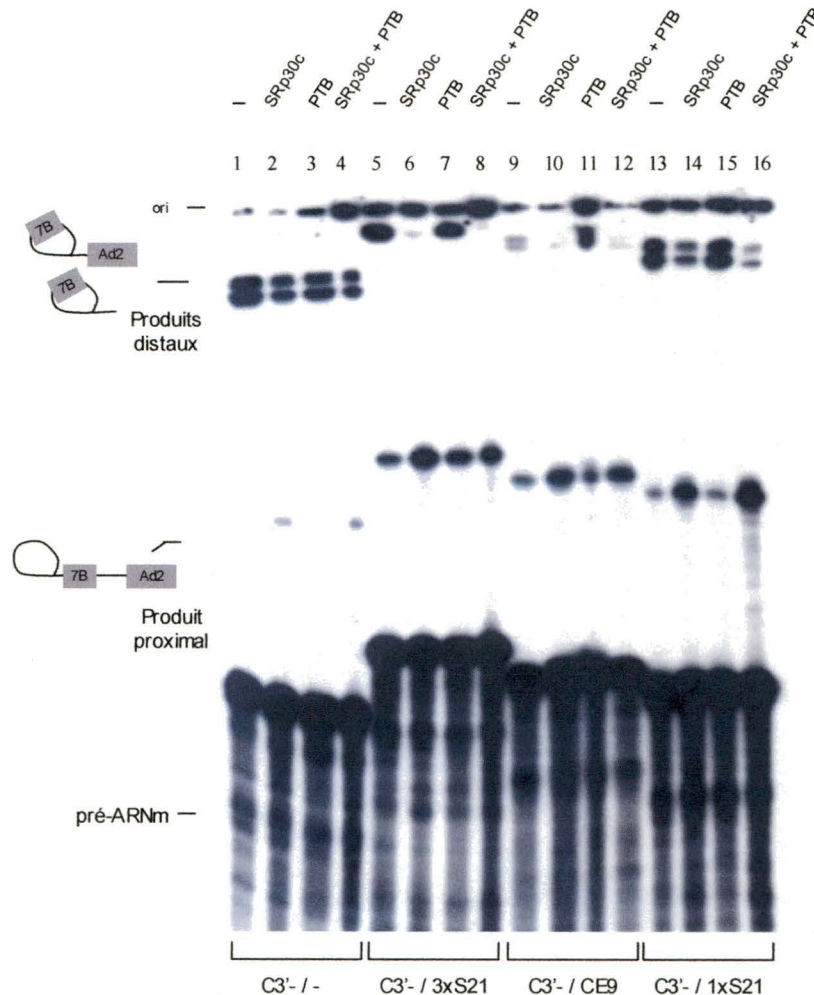


**Figure 8. hnRNP I/PTB interagit avec CE9 et affecte la liaison de SRp30c à CE9.** **A.** Dans un essai de liaison par rétention sur colonne, 5  $\mu$ M de GST-SRp30c était ajoutée aux billes de glutathione-sepharose et à différentes séquences d'ARN radiomarquées. De plus, 5  $\mu$ M de His-PTB était parfois ajoutée afin de vérifier si la présence de celle-ci affectait la liaison de SRp30c à CE9. Des lavages ont été effectués jusqu'à une concentration de 150 mM NaCl. Le graphique représente le pourcentage d'ARN demeurant lié après les lavages à 150 mM NaCl pour les ARNs CE9, CE9-29, CE9-Pyless et S21 et l'écart type est aussi indiquée puisque les essais ont été effectués en triplicata. **B.** Dans un essai de pontage aux ultraviolets en présence d'extraits nucléaires de cellules HeLa, la liaison de His-PTB est aussi observée à l'ARN 3XCE9 (pistes 2, 5, 6 et 7 aux concentrations respectives suivantes: 5  $\mu$ M, 10  $\mu$ M et 15  $\mu$ M). La liaison de 5  $\mu$ M de His-SRp30c est aussi possible dans ces conditions (piste 4) et SRp30c semble avoir une plus grande affinité pour CE9 que PTB lorsque les deux protéines sont ajoutées simultanément (5  $\mu$ M chacune) (comparer les pistes 4 et 5 avec la piste 8).

d'une taille approximative de 40 kDa. L'identité de cette protéine demeure cependant inconnue. Par contre, puisque des études ont montré une interaction de SRp30c avec hTra2 $\beta$  (Kondo et al., 2004; Wang et al., 2005; Young et al., 2002), Philippe Cloutier dans notre laboratoire a examiné la possibilité d'une contribution de hTra2 $\beta$  avec SRp30c dans l'activité de CE9. Bien que hTra2 $\beta$  lie efficacement CE9, l'ajout de la protéine recombinante hTra2 $\beta$  n'avait aucun effet sur l'épissage d'un pré-ARNm contenant la séquence CE9 (données non-montrées). Ainsi, les recherches à ce sujet n'ont pas été poursuivies.

Afin d'examiner la contribution de PTB dans l'activité de l'élément CE9, des essais d'épissage ont été réalisés avec la protéine recombinante His-PTB (Figures 8 et 9). Le premier essai d'épissage a été effectué en utilisant des pré-ARNm où deux sites d'épissage 3' sont en compétition pour un site d'épissage 5' (Figure 9). L'addition de PTB au pré-ARNm contrôle C3'-/- n'a aucun effet sur la sélection des sites d'épissage 3' (Figure 9, piste 3). Les pré-ARNm dérivés de C3'-/-, contenant une ou trois copies de S21 entre les sites d'épissage 3', favorise la sélection des sites d'épissage proximaux (Figure 9, C3'-/1xS21 ou C3'-/3xS21, pistes 13 et 5 respectivement). De plus, l'ajout de la protéine recombinante SRp30c à ces deux pré-ARNm mène aussi à la sélection des sites d'épissage 3' proximaux (Figure 9, pistes 6 et 14). Par contre, l'ajout de PTB n'a pas d'effet sur la sélection des sites d'épissage de ces deux pré-ARNm (Figure 9, pistes 7 et 15). Un pré-ARNm contenant une copie de CE9 (C3'/CE9) favorise aussi la sélection du site d'épissage 3' proximal et cet effet était accentué par l'ajout de la protéine SRp30c (Figure 9, pistes 9 et 10). Il est surprenant

de constater que l'ajout de la protéine recombinante PTB stimule la sélection du site d'épissage distal en présence de l'élément CE9 (Figure 9, piste 11). Cependant, l'ajout



**Figure 9. PTB agit comme antagoniste de l'activité de répression de SRp30c dans un essai d'épissage où deux sites d'épissage 3' sont en compétition.** Les réactions d'épissage ont été effectuées à l'aide d'un extrait nucléaire de cellules HeLa en préincubant les protéines recombinantes pendant 10 min à 30 °C avant l'ajout du pré-ARNm radiomarqué désiré. La position des ARN pré-messagers de même que des produits d'épissage est indiquée. Les produits d'épissage étaient séparés sur un gel de 11 % acrylamide/8 M urée et la concentration de protéines His-PTB ou His-SRp30c ajoutée était de 5µM.

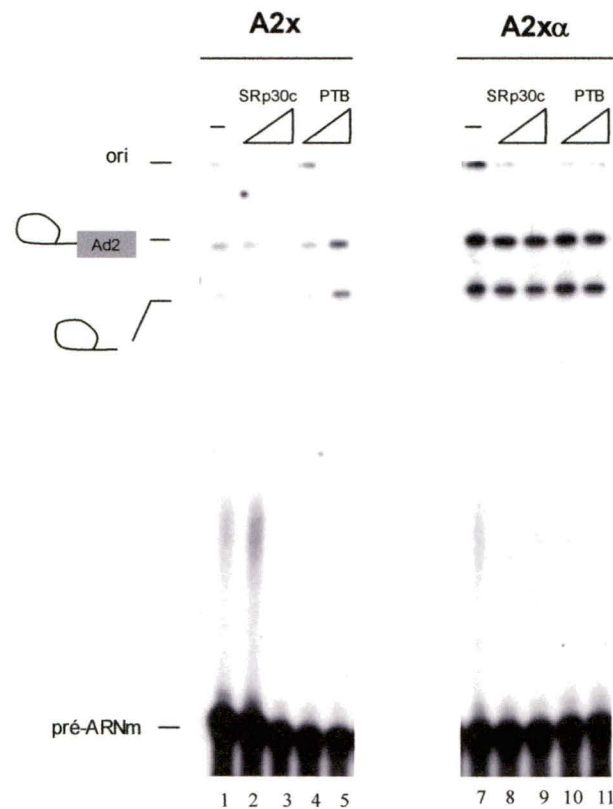


simultané des protéines SRp30c et PTB neutralise l'effet de PTB (Figure 9, piste 12). Ces résultats suggèrent donc des rôles opposés pour les protéines SRp30c et PTB dans un essai d'épissage où un élément CE9 est positionné entre deux sites d'épissage 3'.

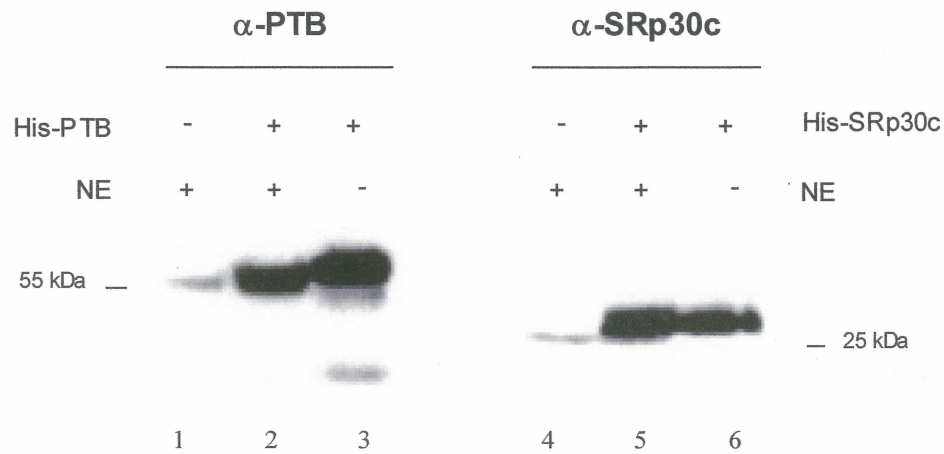
PTB et SRp30c ont des effets opposés et cette action antagoniste a été vérifiée dans un autre essai d'épissage utilisant un pré-ARNm possédant un seul intron (le pré-ARNm A2x et ses dérivés) (Figure 10). Dans cet essai, CE9 inhibe l'épissage et l'ajout de la protéine recombinante SRp30c accentue cette répression (Figure 10, pistes 1-3). Au contraire, l'ajout de PTB stimule l'épissage (Figure 10, pistes 4 et 5). Aucune de ces deux protéines n'a d'effet lorsqu'elles sont incubées en présence du pré-ARNm témoin (A2x $\alpha$ ) (Figure 10, pistes 6-10). Cet essai confirme ainsi les rôles antagonistes des protéines SRp30c et PTB face à l'élément CE9.

L'activité de l'élément CE9 est vraisemblablement déterminée par l'abondance relative des protéines SRp30c et PTB. La présence de l'élément CE9 seul, sans ajout de protéines recombinantes, entraîne une activité de répression de l'épissage. Ainsi, l'activité de la protéine SRp30c endogène dans un extrait nucléaire semble dominante sur l'activité de PTB. En accord avec cette hypothèse, des concentrations molaires équivalentes de protéines recombinantes SRp30c et PTB ajoutées simultanément dans un essai d'épissage indiquent que SRp30c semble aussi exercer un effet dominant par rapport à la protéine PTB (Figure 9, piste 12). Afin de comparer plus précisément l'abondance relative des protéines SRp30c et PTB dans un extrait nucléaire, un immunobuvardage de type Western à l'aide des anticorps anti-PTB et anti-SRp30c a

été effectué (Figure 11). En comparant les signaux obtenus pour les protéines PTB et SRp30c, les deux protéines sont présentes à des concentrations similaires dans un extrait nucléaire (Figure 11, comparer la piste 1 avec la piste 4) et en les comparant avec les signaux obtenus avec 5  $\mu$ M de SRp30c ou PTB recombinant (Figure 11, comparer les pistes 2 et 3 avec les pistes 4 et 5).



**Figure 10. PTB stimule l'épissage d'un pré-ARN messenger préalablement inhibé par la présence de l'élément CE9, alors que SRp30c accentue cette inhibition de l'épissage.** Toutes les réactions d'épissage ont été effectuées à l'aide d'un extrait nucléaire de cellules HeLa en préincubant les protéines recombinantes pendant 10 min à 30 °C avant l'ajout du pré-ARNm radiomarké. La position des pré-ARN messagers de même que des produits d'épissage est indiquée. Les produits d'épissage ont été séparés sur un gel de 6,5% acrylamide/8 M urée. Des concentrations croissantes de His-PTB et His-SRp30c ont été ajoutées (2,5  $\mu$ M et 5  $\mu$ M ).



**Figure 11.** Les protéines SRp30c et PTB sont présentes à des concentrations molaires équivalentes dans un extrait nucléaire de cellules HeLa. Afin de déterminer l'abondance relative des protéines SRp30c et PTB dans un extrait nucléaire de cellules HeLa, une analyse par immunobuvardage de type Western a été réalisée. Les échantillons ont d'abord été fractionnés sur un gel d'acrylamide 12%/SDS avant d'être transférés sur une membrane de nitrocellulose. Pour la détection, les anticorps primaires utilisés sont indiqués ( $\alpha$ -SRp30c et  $\alpha$ -PTB) et la concentration de protéine His-PTB et His-SRp30c ajoutée est de 5  $\mu$ M. La détection des protéines SRp30c et PTB endogènes dans un extrait nucléaire (NE) (pistes 1 et 4) a été effectuée avec leurs anticorps respectifs.

## Discussion

### Un site de liaison optimal pour la protéine SRp30c

L'analyse des séquences récupérées selon la procédure SELEX avec la protéine recombinante GST-SRp30c montre un enrichissement considérable pour le motif ASSAS (S = G ou C). La séquence AGGAC est celle qui était la plus fréquemment rencontrée car sept clones des 37 séquences obtenues possèdent ce motif et deux clones présentent même deux fois ce motif. Les autres séquences qui sont les plus souvent rencontrées sont AGCAG (6 clones) et AGGAG (4 clones). Par la suite, des expériences de gel de retardement avec des oligos d'ARN portant certaines mutations ont indiqué que la présence de deux motifs AGGAC permet une liaison optimale de la protéine SRp30c. La conversion d'un seul des motifs AGGAC en AGCAC diminue fortement l'efficacité de liaison de SRp30c.

Le Tableau 2 montre qu'une portion de la séquence consensus SELEX AGGAC pour SRp30c se retrouve dans la partie de CE9 liée par SRp30c (CUGGAUU). Une étude antérieure a montré qu'en mutant les purines de la portion 5' de CE9 (CUGGAUU converti en CUGAGUU), la liaison de SRp30c était fortement réduite (Simard et Chabot, 2002). Dans nos expériences de gel de retardement, nous montrons que la protéine SRp30c lie S21, une séquence contenant deux motifs AGGAC, avec une affinité supérieure à l'élément CE9. Trois copies de CE9 permettent cependant de

reproduire l'efficacité de liaison observée avec SRp30c et S21. De plus, le tableau 2 indique que d'autres sites de liaison précédemment montrés comme pouvant être liés par SRp30c ont certaines similarités avec le site consensus déterminé par SELEX. Cependant, ces sites seraient des sites de relativement faible affinité pour SRp30c puisqu'ils divergent du site de liaison optimal identifié. Par exemple, le site retrouvé dans l'exon 7 de SMN requiert la présence de la protéine hTRA2 $\beta$  pour permettre la liaison de SRp30c (Young et al., 2002). Ainsi, un site de liaison pour SRp30c pourrait nécessiter la présence de plusieurs sites faibles afin d'augmenter l'efficacité de liaison globale ou une collaboration avec une autre protéine pour stabiliser l'interaction de SRp30c à un site de plus faible affinité.

AGG <u>A</u> C	SELEX (S21)
CUGG <u>A</u> U	CE9 (CE9.7)
AAAGAAGG <u>A</u> A	SMN exon 7
AGAA <u>U</u>	Tau exon 2
AGAUAAUUA <u>A</u> UAAGAAG	Tau exon 10

**Tableau 2. Motifs d'ARN associés à la liaison de SRp30c.** Le meilleur alignement possible par rapport à la séquence SELEX (S21) est représenté dans la boîte grise. Les nucléotides soulignés affectent la liaison de SRp30c lorsque mutés.

Le motif AGGAC fait aussi partie du site de haute affinité identifiée par SELEX pour la protéine ASF/SF2 (AGGACARRAGC ; (Tacke et Manley, 1995). Ces résultats laissent croire que la séquence S21 pourrait aussi être liée par ASF/SF2 et SRp30c

pourrait ainsi agir comme un antagoniste fonctionnel de ASF/SF2 dans certaines conditions. Cependant, cette régulation de SRp30c pour des séquences activatrices de l'épissage liées par ASF/SF2 demeure une hypothèse inexplorée. Il est aussi possible que cette régulation se produise dans le sens inverse et ASF/SF2 pourrait aussi interagir avec des séquences liées par SRp30c. Nous avons d'ailleurs montré que la protéine recombinante GST-ASF/SF2 peut interagir avec S21, mais avec une plus faible affinité que SRp30c. Par contre, la liaison de ASF/SF2 à CE9 n'est que très faiblement détectable dans une expérience de gel de retardement. Malgré tout, l'addition de la protéine recombinante ASF/SF2 à des réactions d'épissage renverse l'activité d'inhibition en présence de l'élément CE9 seulement. Par contre, l'ajout de ASF/SF2 dans l'essai d'épissage où deux sites d'épissage 3' sont en compétition n'a pas d'effet spécifique en présence de CE9 ou de S21 et ne semble donc pas interférer avec l'activité répressive de SRp30c dans ces conditions. Ces résultats suggèrent la possibilité d'un rôle antagoniste pour la protéine ASF/SF2 par rapport à l'activité de répression de SRp30c, mais dans certaines conditions seulement. Il est aussi possible que SRp30c et ASF/SF2 aient des activités similaires dans d'autres situations, notamment lorsqu'elles se lient en amont d'un site d'épissage 5' (revu dans Graveley, 2000).

### **Le rôle de SRp30c dans l'activité de l'élément répresseur CE9**

L'activité de l'élément CE9 a été observée dans deux essais d'épissage distincts. Tout d'abord en positionnant CE9 entre deux sites d'épissage 3' en compétition pour un

site d'épissage 5' ou dans l'intron d'une unité d'épissage ne contenant qu'un seul intron. Dans le premier cas, ICE9 stimule la sélection du site d'épissage 3' proximal. Dans le second, deux ou trois copies de CE9 inhibent l'épissage. Ces résultats indiquent que l'essai d'épissage avec deux sites 3' est plus sensible que l'essai d'inhibition pour détecter l'activité de CE9 puisque la présence de CE9 dans un pré-ARNm à un seul intron mène à une répression de l'épissage. La sélection du site d'épissage 3' proximal dans l'essai de compétition se fait en réprimant le site d'épissage distal en aval de CE9. L'importance de la protéine SRp30c a été montrée dans ces deux systèmes. L'augmentation de la concentration de la protéine recombinante SRp30c dans des réactions d'épissage *in vitro* accentue à la fois la sélection du site d'épissage 3' proximal dans l'essai de compétition ainsi que la répression de l'épissage dans l'essai d'inhibition en présence de l'élément CE9. Soulignons aussi que plusieurs copies de la séquence de haute affinité pour SRp30c (S21) insérées entre deux sites d'épissage 3' en compétition pour un site d'épissage 5' reproduisent l'effet d'une seule copie de CE9. Un site de liaison de plus faible affinité pour SRp30c, tel 2XCE9.7, mène à une inhibition partielle de l'épissage en comparaison à l'insertion de l'élément complet de CE9 (Simard et Chabot, 2002). Ces résultats montrent donc l'importance de la protéine SRp30c dans l'activité de répression de CE9. De plus, la présence d'un site ayant une affinité assez élevée pour SRp30c, étant suffisante pour imposer une activité, la contribution d'un autre facteur liant SRp30c ne serait pas nécessaire à moins que ce dernier stimule la liaison de SRp30c. Ainsi, en présence d'un site de liaison procurant une interaction suffisamment forte pour la protéine SRp30c, des séquences additionnelles ne seraient

pas requises pour permettre l'activité de répression de cette protéine. Par contre, dans le cas où un site de plus faible affinité pour SRp30c est utilisé, tel CE9.7, des séquences adjacentes pourraient s'avérer importantes pour stimuler ou stabiliser la liaison de SRp30c. C'est possiblement pour cette raison que SRp30c interagit avec l'élément situé dans l'exon 7 de SMN seulement si la protéine hTra2 $\beta$  lie d'abord l'élément riche en purines (Young et al., 2002). Ainsi, lorsqu'un site de faible affinité pour SRp30c est présent, la collaboration avec une autre protéine pourrait faciliter sa liaison. Dans le cas de la régulation de l'élément CE9, des séquences additionnelles se trouvant à l'extrémité 3' de CE9 pourrait stabiliser l'interaction de SRp30c à la partie 5' de CE9. Nous avons d'ailleurs montré qu'un oligo possédant les portions 5' et 3' de CE9 interagit avec SRp30c de la façon comparable à l'élément CE9 complet, alors qu'en présence de la séquence 5' seulement de CE9 l'interaction de SRp30c est plus faible. De plus, la séquence AGAAU qui se trouve à l'extrémité 3' de CE9 (AGAGAAUGAA) est un site de liaison pour SRp30c lorsque retrouvée dans l'exon 2 de tau (Wang et al., 2005). Ces observations suggèrent que la portion 3' de CE9 contribuent à la liaison de SRp30c à CE9 et favorise ainsi son activité de répression dans l'épissage.

### **La protéine hnRNP I/PTB comme anti-répresseur de SRp30c**

Dans le but d'identifier des facteurs additionnels qui pourraient interagir avec l'élément CE9, la séquence d'ARN complète de CE9 (38nt) a été utilisée pour effectuer une chromatographie d'affinité en présence d'un extrait nucléaire de cellules



HeLa. Rappelons-nous que cette même expérience avait été effectuée par Martin Simard en utilisant les 16 premiers nucléotides, ce qui avait permis d'isoler la protéine SRp30c. Suite à la chromatographie d'affinité avec la séquence complète de CE9, la protéine hnRNP I/PTB a été récupérée et identifiée par spectrométrie de masse. Dans de nombreux exemples, la protéine PTB est reconnue pour permettre la répression de l'épissage via des éléments inhibiteurs (revu dans Wagner et Garcia-Blanco, 2001). Les sites de liaison pour PTB contiennent typiquement un mélange de C et de U (Chan et Black, 1997; Perez et al., 1997b). L'élément CE9 contient la séquence CCUUUCCC qui peut correspondre à un site de liaison pour PTB. Nous avons montré que PTB lie CE9 et qu'en absence de la séquence riche en C et U la liaison de PTB à CE9 est grandement diminuée. Nous nous attendions donc à répertorier un autre exemple de régulation négative par PTB. Nous avons été surpris de constater que l'ajout de la protéine recombinante PTB dans des réactions d'épissage *in vitro* avec des pré-ARNm contenant l'élément CE9 contrecarrait l'activité de CE9 plutôt que de la stimuler. En effet, l'ajout de PTB dans un essai de compétition stimule la sélection du site d'épissage 3' distal de façon CE9 dépendante. De plus, l'ajout de PTB dans un essai d'inhibition de l'épissage renverse l'inhibition de l'épissage créée par la présence de plusieurs copies introniques de CE9. Il est important de souligner que l'ajout de PTB aux pré-ARNm ne contenant pas l'élément CE9, n'a aucun impact sur l'efficacité et les profils d'épissage de ceux-ci. Finalement, l'ajout de SRp30c simultanément à PTB éliminait l'activité de PTB. Ces résultats suggèrent donc une activité dominante de SRp30c par rapport à PTB et un rôle antagoniste de PTB dans l'activité de répression de CE9. Ces observations renversent donc la vision actuelle de

PTB comme ayant exclusivement une fonction inhibitrice dans l'épissage (revu dans Wagner et Garcia-Blanco, 2001).

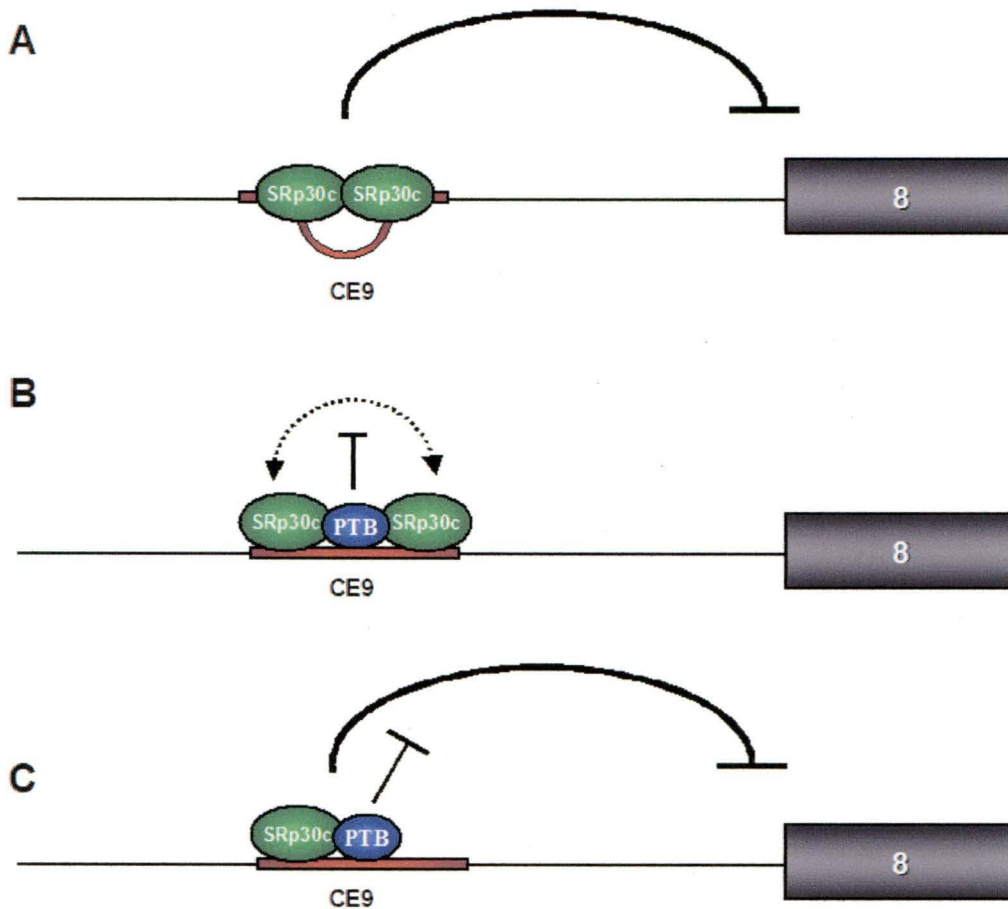
La liaison de PTB à des éléments introniques inhibiteurs a été décrite à plusieurs reprises (Ashiya et Grabowski, 1997; Carstens et al., 2000; Chan et Black, 1997; Cote et al., 2001; Gooding et al., 1998; Gromak et al., 2003; Mulligan et al., 1992; Norton, 1994; Southby et al., 1999). Une exception possible au rôle de répression de PTB a été documentée dans le cas du gène de calcitonine/CGRP où PTB stimule l'inclusion de l'exon 4 (Lou et al., 1999). Cependant, l'activation par PTB serait indirecte dans cette situation (revu dans Wagner et Garcia-Blanco, 2001; Wollerton et al., 2004). PTB a aussi la capacité de lier des éléments exoniques inhibiteurs (Shen et al., 2004; Zheng et al., 1998). Pour les exemples davantage étudiés, PTB a été montré pour s'associer à d'autres protéines et ainsi permettre la formation de complexes multiprotéiques (Chan et Black, 1997; Chou et al., 2000; Grossman et al., 1998; Smith et Valcarcel, 2000). Par exemple, pour le pré-ARNm de  $\alpha$ -tropomyosine, la protéine Raver1 a été identifiée comme étant importante pour le recrutement de PTB et ainsi permettre la répression dans l'épissage (Gromak et al., 2003). Le seul exemple où PTB ne semble pas jouer un rôle favorisant la répression est le cas de l'épissage alternatif de l'exon N1 de c-src (Markovtsov et al., 2000). Dans cette situation, les cellules neuronales produisent un homologue de PTB, nommé nPTB, qui possède une activité de répression plus faible que la protéine PTB. La protéine nPTB a alors été proposée pour agir comme antagoniste pour l'assemblage d'un complexe répresseur en empêchant la liaison de PTB et en modifiant les interaction avec d'autres facteurs

auxillaires. Dans le cas de l'élément CE9, l'implication de facteurs additionnels pour la fonction d'anti-répression de PTB n'est pas exclue, bien qu'aucun facteur ne soit pour le moment identifié. Cependant, nous avons remarqué qu'en ajoutant PTB à un extrait nucléaire de cellules HeLa en présence de CE9 dans un essai de pontage aux ultraviolets, la liaison d'une protéine migrant à environ 40 kDa est clairement observée. L'identité et la contribution de cette protéine dans la fonction d'anti-répression de PTB ne sont pas encore démontrées et des études plus approfondies à ce sujet pourraient clarifier cette observation.

Le mécanisme par lequel PTB antagonise l'activité de répression de CE9 semble impliquée une interférence dans la liaison de la protéine SRp30c. En effet, le site putatif pour la liaison de PTB (CCUUUCCC) est situé entre les portions 5' et 3' de l'élément CE9. Les portions 5' et 3' de CE9 sont importantes pour la liaison de SRp30c. La portion 5' est liée par SRp30c, alors que l'extrémité 3' confère une plus grande affinité de liaison pour SRp30c lorsqu'elle est en présence de la portion 5'. Ainsi, la portion 3' serait importante pour la stabilisation de la liaison de SRp30c à CE9. Bien que la liaison directe de SRp30c à la partie 3' seulement de CE9 n'est pas détectable, la liaison de SRp30c à CE9-Pyless (contenant les portions 5' et 3' de CE9) est comparable à la séquence CE9 complète, alors que la liaison de SRp30c est plus faible en présence de la portion 5' seulement. Ces observations suggèrent que la partie 3' de CE9 favorise ou stabilise la liaison de SRp30c à CE9 suite à une coopération avec la partie 5'. Nous avons montré que PTB n'interfère pas avec la liaison de SRp30c à la partie 5' de CE9, mais prévient plutôt l'augmentation de l'efficacité de

liaison habituellement observée en présence de l'extrémité 3' de CE9. Ainsi, la protéine PTB interfère avec la liaison de SRp30c à l'extrémité 3' et/ou empêche la communication entre les portions 5' et 3' de CE9 permettant une liaison plus efficace de SRp30c (Schéma 12B). Un mécanisme ressemblant à celui-ci a d'ailleurs récemment été décrit pour l'activité de répression de PTB. C'est l'exemple du récepteur Fas où la liaison exonique de PTB prévenait la communication entre le snRNP U1 et U2AF en empêchant ainsi la définition de l'exon (Izquierdo et al., 2005) (Schéma 6C). Dans plusieurs autres exemples où PTB permet la répression, il a été montré que PTB pouvait compromettre la liaison de plusieurs facteurs génériques impliqués dans l'épissage (Lin et Patton, 1995). La répression peut aussi survenir par l'interaction entre deux protéines PTB liées à des sites distincts sur le pré-ARNm. Cette interaction mènerait à la formation d'une boucle qui serait ainsi excisée sans intervenir directement sur la liaison des facteurs d'épissage (revu dans (Amir-Ahmady et al., 2005; Wagner et Garcia-Blanco, 2001). Bien que la présence de plusieurs sites de liaison pour PTB soient généralement nécessaires pour permettre la répression de l'épissage, il a aussi été démontré qu'un seul site de liaison pour PTB pouvait être associé à l'inhibition de l'épissage (Shen et al., 2004). Étant donné que PTB affecte l'activité de CE9 pour différents pré-ARNm, il est peu probable que plusieurs sites de liaison pour PTB participent à la fonction d'anti-répression de PTB. De plus, la portion riche en pyrimidines de CE9 est située à plus de 13 nucléotides en aval des sept premiers nucléotides montrés importants à la liaison de SRp30c (Simard et Chabot, 2002), il est donc plausible que PTB interfère avec la liaison de SRp30c à la portion 3'. Le schéma 12 illustre d'ailleurs le mode de régulation proposé pour

l'élément CE9 par les protéines SRp30c et PTB. Il n'est cependant pas exclu que PTB pourrait aussi prévenir l'interaction entre certains facteurs et SRp30c, qui pourraient contribuer à diminuer l'activité de répression de SRp30c.



**Schéma 12. Modèles de régulation du pré-ARNm de hnRNP A1 par l'élément CE9 ainsi que les protéines SRp30c et PTB.** A. Modèle de répression du site d'épissage 3' de l'exon 8 par CE9 et SRp30c en absence de PTB. B. Modèle illustrant que PTB pourrait empêcher la stabilisation de la liaison de SRp30c à la portion 3' de CE9 en interférant ainsi avec la communication entre deux molécules SRp30c. C. Modèle montrant qu'en présence de PTB, la liaison de SRp30c à la portion 3' de CE9 est compromise ce qui préviendrait l'activité de répression de SRp30c au site d'épissage 3' de l'exon 8 du pré-ARNm de hnRNP A1.

## **La régulation de l'épissage par des facteurs antagonistes**

La régulation des événements d'épissage alternatif par l'activité antagoniste entre de multiples facteurs sont des stratégies couramment employées par la cellule. Par exemple, la liaison de protéines SR à des éléments exoniques activateurs est importante pour renverser l'activité de répression d'un élément inhibiteur situé à proximité dans le cas du pré-ARNm de hnRNP A1 (Zhu et al., 2001). C'est aussi le cas pour la régulation de l'exon alternatif de  $\alpha$ -tropomyosine chez l'humain où la liaison de la protéine hnRNP G empêche l'action activatrice de hTra2 $\beta$  (Nasim et al., 2003). La protéine hnRNPI/PTB a d'ailleurs été impliquée dans des exemples de régulation antagoniste. PTB peut diminuer la liaison de ETR-3 à des éléments introniques et ainsi empêcher l'inclusion de l'exon 5 du pré-ARN messager encodant pour la troponine T cardiaque (Charlet et al., 2002). PTB peut aussi interférer avec la liaison de facteurs d'épissage comme U2AF au site d'épissage 3' du pré-ARNm de  $\alpha$ -tropomyosine (Lin et Patton, 1995). De plus, nPTB peut aussi avoir une action antagoniste sur l'activité de répression de PTB sur l'épissage de c-src (Markovtsov et al., 2000). Ainsi, l'exemple de PTB agissant comme antagoniste de l'activité de répression de la protéine SRp30c pour la régulation de l'épissage via l'élément CE9 s'ajoute à cette longue liste de régulation de l'épissage par des facteurs aux actions antagonistes. La synergie entre facteurs est aussi fréquemment rencontrée pour contrôler les événements d'épissage alternatif. Il est donc possible que d'autres facteurs puissent coopérer avec SRp30c pour favoriser son activité de répression via l'élément CE9 ou avec PTB pour stimuler son activité d'anti-répression. De plus,

nous poursuivons actuellement des expériences *in vivo* afin de vérifier les profils d'épissage du pré-ARN messager de hnRNP A1 endogène ainsi que d'un minigène contenant une ou plusieurs copies de CE9 lorsque l'expression des protéines SRp30c ou PTB est diminuée par interférence à ARN dans différentes lignées cellulaires. Il serait aussi intéressant de vérifier si la fonction d'anti-répression de PTB est impliquée dans d'autres exemples de contrôle de l'épissage. Notre étude ré-itere le fait que de nombreux éléments et facteurs sont nécessaires pour contrôler un seul événement d'épissage alternatif. Ainsi, la régulation du pré-ARN messager de hnRNP A1 n'est qu'un exemple isolé qui illustre la complexité des événements d'épissage présents dans une cellule.

## Conclusion

Somme toute, nous avons identifié un site de haute affinité pour la protéine SRp30c, la séquence S21, qui contient deux motifs AGGAC. Par ailleurs, nous avons caractérisé davantage l'élément intronique CE9 situé entre l'exon 7B et 8 du pré-ARNm de hnRNP A1. Ainsi, nous avons confirmé la régulation de CE9 par la protéine SRp30c. Nous avons aussi montré que la portion 3' de CE9, en collaboration avec la portion 5', jouait un rôle pour la liaison de SRp30c. Nous avons ensuite isolé par une chromatographie d'affinité, effectuée avec la séquence complète de CE9, une autre protéine impliquée dans la régulation de cet élément : hnRNP/I PTB. Contrairement aux nombreux exemples répertoriés, PTB n'avait pas un rôle de répression dans l'épissage, mais agissait plutôt comme anti-répresseur de l'action inhibitrice de SRp30c via l'élément CE9. Nous avons ainsi montré la capacité de PTB de lier CE9 et d'interférer avec la liaison de SRp30c à la portion 3' de CE9, en plus de montrer que PTB pouvait antagoniser l'effet de SRp30c dans deux essais d'épissage distincts *in vitro*. Tel que mentionné ci-haut, nous tentons actuellement d'examiner les profils d'épissage du pré-ARNm de hnRNP A1 endogène ainsi que d'un minigène contenant l'élément CE9 dans des expériences *in vivo* en diminuant l'expression des protéines SRp30c et PTB.

Finalement, bien que les études à l'échelle génomique procurent des informations importantes sur de nombreux événements d'épissage alternatif, il n'en demeure pas



moins que pour comprendre précisément les mécanismes de régulation de l'épissage il faut bien souvent les étudier en utilisant des pré-ARNm modèles simples, tel que le pré-ARNm de hnRNP A1. Il est ensuite possible de vérifier si ces modes de régulation peuvent être extrapolés à d'autres pré-ARNm et ainsi considérer ces mécanismes dans un ensemble plus global. L'ampleur de tous les mécanismes de régulation à l'œuvre dans une cellule est telle que d'élucider chacun d'entre-eux demeure un défi immense.

## **Remerciements**

Je tiens tout d'abord à remercier mon directeur de recherche pour m'avoir accueilli dans son laboratoire et pour la confiance qu'il m'a accordé au cours des dernières années. Grâce à ses nombreux encouragements et à son éternel optimisme, il m'a appris à croire davantage en mes capacités et à développer un esprit critique. Je tiens à souligner sa très grande intégrité scientifique, sa gentillesse, sa compréhension ainsi que son dévouement. Je lui porte le plus grand respect ainsi qu'une sincère admiration.

Je remercie les Docteurs Jocelyn Côté et Roscoe Klinck pour avoir accepté de prendre de leur précieux temps pour effectuer la correction de ce mémoire. De plus, je tiens à remercier chacun des membres du laboratoire Chabot qui auront par leur humour, leur aide, leurs conseils et leur support fait de ce séjour au laboratoire des moments inoubliables. Je remercie aussi spécialement Philippe Cloutier pour assurer la continuité du projet. Un merci particulier à Johanne Toutant pour son écoute attentive et son efficacité exceptionnelle dans le laboratoire.

Je remercie aussi mes parents ainsi que mes proches pour leur présence et leurs encouragements. Le simple fait de savoir qu'ils étaient derrière moi et m'appuyaient dans mes projets m'a bien souvent donné le courage de continuer...

Merci à vous tous ! Vous allez sincèrement me manquer...

## Références

- Amir-Ahmady, B., Boutz, P.L., Markovtsov, V., Phillips, M.L., and Black, D.L.** (2005). *Exon repression by polypyrimidine tract binding protein*. RNA (New York, NY 11, 699-716.
- Ares, M., Jr., and Weiser, B.** (1995). *Rearrangement of snRNA structure during assembly and function of the spliceosome*. Progress in nucleic acid research and molecular biology 50, 131-159.
- Ashiya, M., and Grabowski, P.J.** (1997). *A neuron-specific splicing switch mediated by an array of pre-mRNA repressor sites: evidence of a regulatory role for the polypyrimidine tract binding protein and a brain-specific PTB counterpart*. RNA (New York, NY 3, 996-1015.
- Berget, S.M.** (1995). *Exon recognition in vertebrate splicing*. The Journal of biological chemistry 270, 2411-2414.
- Berglund, J.A., Abovich, N., and Rosbash, M.** (1998). *A cooperative interaction between U2AF65 and mBBP/SF1 facilitates branchpoint region recognition*. Genes & development 12, 858-867.
- Bilodeau, P.S., Domsic, J.K., Mayeda, A., Krainer, A.R., and Stoltzfus, C.M.** (2001). *RNA splicing at human immunodeficiency virus type 1 3' splice site A2 is regulated by binding of hnRNP A/B proteins to an exonic splicing silencer element*. Journal of virology 75, 8487-8497.
- Black, D.L.** (2000). *Protein diversity from alternative splicing: a challenge for bioinformatics and post-genome biology*. Cell 103, 367-370.
- Black, D.L.** (2003). *Mechanisms of alternative pre-messenger RNA splicing*. Annual review of biochemistry 72, 291-336.
- Blanchette, M., and Chabot, B.** (1997). *A highly stable duplex structure sequesters the 5' splice site region of hnRNP A1 alternative exon 7B*. RNA (New York, NY 3, 405-419.
- Blanchette, M., and Chabot, B.** (1999). *Modulation of exon skipping by high-affinity hnRNP A1-binding sites and by intron elements that repress splice site utilization*. The EMBO journal 18, 1939-1952.

- Boise, L.H., Gonzalez-Garcia, M., Postema, C.E., Ding, L., Lindsten, T., Turka, L.A., Mao, X., Nunez, G., and Thompson, C.B. (1993).** *bcl-x, a bcl-2-related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death.* Cell 74, 597-608.
- Bourgeois, C.F., Popielarz, M., Hildwein, G., and Stevenin, J. (1999).** *Identification of a bidirectional splicing enhancer: differential involvement of SR proteins in 5' or 3' splice site activation.* Molecular and cellular biology 19, 7347-7356.
- Buvoli, M., Cobianchi, F., Bestagno, M., Bassi, M.T., Biamonti, G., and Riva, S. (1990a).** *A second A1-type protein is encoded by the human hnRNP A1 gene.* Molecular biology reports 14, 83-84.
- Buvoli, M., Cobianchi, F., Bestagno, M.G., Mangiarotti, A., Bassi, M.T., Biamonti, G., and Riva, S. (1990b).** *Alternative splicing in the human gene for the core protein A1 generates another hnRNP protein.* The EMBO journal 9, 1229-1235.
- Buvoli, M., Cobianchi, F., Biamonti, G., and Riva, S. (1990c).** *Recombinant hnRNP protein A1 and its N-terminal domain show preferential affinity for oligodeoxynucleotides homologous to intron/exon acceptor sites.* Nucleic acids research 18, 6595-6600.
- Caceres, J.F., and Kornblihtt, A.R. (2002).** *Alternative splicing: multiple control mechanisms and involvement in human disease.* Trends Genet 18, 186-193.
- Caceres, J.F., Stamm, S., Helfman, D.M., and Krainer, A.R. (1994).** *Regulation of alternative splicing in vivo by overexpression of antagonistic splicing factors.* Science 265, 1706-1709.
- Caputi, M., Mayeda, A., Krainer, A.R., and Zahler, A.M. (1999).** *hnRNP A/B proteins are required for inhibition of HIV-1 pre-mRNA splicing.* The EMBO journal 18, 4060-4067.
- Caputi, M., and Zahler, A.M. (2002).** *SR proteins and hnRNP H regulate the splicing of the HIV-1 tev-specific exon 6D.* The EMBO journal 21, 845-855.
- Carstens, R.P., Wagner, E.J., and Garcia-Blanco, M.A. (2000).** *An intronic splicing silencer causes skipping of the IIIb exon of fibroblast growth factor receptor 2 through involvement of polypyrimidine tract binding protein.* Molecular and cellular biology 20, 7388-7400.
- Cartegni, L., Chew, S.L., and Krainer, A.R. (2002).** *Listening to silence and understanding nonsense: exonic mutations that affect splicing.* Nature reviews 3, 285-298.

- Cartegni, L., Maconi, M., Morandi, E., Cobianchi, F., Riva, S., and Biamonti, G.** (1996). *hnRNP A1 selectively interacts through its Gly-rich domain with different RNA-binding proteins*. *Journal of molecular biology* 259, 337-348.
- Cavaloc, Y., Bourgeois, C.F., Kister, L., and Stevenin, J.** (1999). *The splicing factors 9G8 and SRp20 transactivate splicing through different and specific enhancers*. *RNA* (New York, NY 5, 468-483.
- Chabot, B.** (1994). *Synthesis and Purification of RNA Substrates*. In *RNA processing*, D. Hames, and S. Higgins, eds., Vol I (Oxford, Oxford University Press).
- Chabot, B.** (1996). *Directing alternative splicing: cast and scenarios*. *Trends Genet* 12, 472-478.
- Chabot, B., Blanchette, M., Lapierre, I., and La Branche, H.** (1997). *An intron element modulating 5' splice site selection in the hnRNP A1 pre-mRNA interacts with hnRNP A1*. *Molecular and cellular biology* 17, 1776-1786.
- Chabot, B., LeBel, C., Hutchison, S., Nasim, F.H., and Simard, M.J.** (2003). *Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein particle A/B proteins and the control of alternative splicing of the mammalian heterogeneous nuclear ribonucleoprotein particle A1 pre-mRNA*. *Progress in molecular and subcellular biology* 31, 59-88.
- Chan, R.C., and Black, D.L.** (1995). *Conserved intron elements repress splicing of a neuron-specific c-src exon in vitro*. *Molecular and cellular biology* 15, 6377-6385.
- Chan, R.C., and Black, D.L.** (1997). *The polypyrimidine tract binding protein binds upstream of neural cell-specific c-src exon N1 to repress the splicing of the intron downstream*. *Molecular and cellular biology* 17, 4667-4676.
- Charlet, B.N., Logan, P., Singh, G., and Cooper, T.A.** (2002). *Dynamic antagonism between ETR-3 and PTB regulates cell type-specific alternative splicing*. *Molecular cell* 9, 649-658.
- Chew, S.L., Liu, H.X., Mayeda, A., and Krainer, A.R.** (1999). *Evidence for the function of an exonic splicing enhancer after the first catalytic step of pre-mRNA splicing*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 10655-10660.
- Chou, M.Y., Rooke, N., Turck, C.W., and Black, D.L.** (1999). *hnRNP H is a component of a splicing enhancer complex that activates a c-src alternative exon in neuronal cells*. *Molecular and cellular biology* 19, 69-77.
- Chou, M.Y., Underwood, J.G., Nikolic, J., Luu, M.H., and Black, D.L.** (2000). *Multisite RNA binding and release of polypyrimidine tract binding protein during the regulation of c-src neural-specific splicing*. *Molecular cell* 5, 949-957.

- Cote, J., Dupuis, S. and Wu, J.Y. (2001).** *PTB binding downstream of caspase-2 alternative exon 9 represses its inclusion.* Journal of Biological Chemistry 276, 8535-8543.
- Cote, J., Simard, M.J., and Chabot, B. (1999).** *An element in the 5' common exon of the NCAM alternative splicing unit interacts with SR proteins and modulates 5' splice site selection.* Nucleic acids research 27, 2529-2537.
- Del Gatto-Konczak, F., Bourgeois, C.F., Le Guiner, C., Kister, L., Gesnel, M.C., Stevenin, J., and Breathnach, R. (2000).** *The RNA-binding protein TIA-1 is a novel mammalian splicing regulator acting through intron sequences adjacent to a 5' splice site.* Molecular and cellular biology 20, 6287-6299.
- Dignam, J.D., Lebovitz, R.M., and Roeder, R.G. (1983).** *Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei.* Nucleic acids research 11, 1475-1489.
- Dreyfuss, G., Matunis, M.J., Pinol-Roma, S., and Burd, C.G. (1993).** *hnRNP proteins and the biogenesis of mRNA.* Annual review of biochemistry 62, 289-321.
- Elrick, L.L., Humphrey, M.B., Cooper, T.A., and Berget, S.M. (1998).** *A short sequence within two purine-rich enhancers determines 5' splice site specificity.* Molecular and cellular biology 18, 343-352.
- Eperon, I.C., Ireland, D.C., Smith, R.A., Mayeda, A., and Krainer, A.R. (1993).** *Pathways for selection of 5' splice sites by U1 snRNPs and SF2/ASF.* The EMBO journal 12, 3607-3617.
- Estmer Nilsson, C., Petersen-Mahrt, S., Durot, C., Shtrichman, R., Krainer, A.R., Kleinberger, T., and Akusjarvi, G. (2001).** *The adenovirus E4-ORF4 splicing enhancer protein interacts with a subset of phosphorylated SR proteins.* The EMBO journal 20, 864-871.
- Faustino, N.A., and Cooper, T.A. (2003).** *Pre-mRNA splicing and human disease.* Genes & development 17, 419-437.
- Fu, X.D., Mayeda, A., Maniatis, T., and Krainer, A.R. (1992).** *General splicing factors SF2 and SC35 have equivalent activities in vitro, and both affect alternative 5' and 3' splice site selection.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 89, 11224-11228.
- Garcia-Blanco, M.A., Jamison, S.F., and Sharp, P.A. (1989).** *Identification and purification of a 62,000-dalton protein that binds specifically to the polypyrimidine tract of introns.* Genes & development 3, 1874-1886.

- Gil, A., Sharp, P.A., Jamison, S.F., and Garcia-Blanco, M.A.** (1991). *Characterization of cDNAs encoding the polypyrimidine tract-binding protein*. *Genes & development* 5, 1224-1236.
- Gooding, C., Roberts, G.C., Moreau, G., Nadal-Ginard, B., and Smith, C.W.** (1994). *Smooth muscle-specific switching of alpha-tropomyosin mutually exclusive exon selection by specific inhibition of the strong default exon*. *The EMBO journal* 13, 3861-3872.
- Gooding, C., Roberts, G.C., and Smith, C.W.** (1998). *Role of an inhibitory pyrimidine element and polypyrimidine tract binding protein in repression of a regulated alpha-tropomyosin exon*. *RNA* (New York, NY 4, 85-100.
- Graveley, B.R.** (2000). *Sorting out the complexity of SR protein functions*. *RNA* (New York, NY 6, 1197-1211.
- Graveley, B.R., and Maniatis, T.** (1998). *Arginine/serine-rich domains of SR proteins can function as activators of pre-mRNA splicing*. *Molecular cell* 1, 765-771.
- Gromak, N., Rideau, A., Southby, J., Scadden, A.D., Gooding, C., Huttelmaier, S., Singer, R.H., and Smith, C.W.** (2003). *The PTB interacting protein raver1 regulates alpha-tropomyosin alternative splicing*. *The EMBO journal* 22, 6356-6364.
- Grossman, J.S., Meyer, M.I., Wang, Y.C., Mulligan, G.J., Kobayashi, R., and Helfman, D.M.** (1998). *The use of antibodies to the polypyrimidine tract binding protein (PTB) to analyze the protein components that assemble on alternatively spliced pre-mRNAs that use distant branch points*. *RNA* (New York, NY 4, 613-625.
- Hanamura, A., Caceres, J.F., Mayeda, A., Franza, B.R., Jr., and Krainer, A.R.** (1998). *Regulated tissue-specific expression of antagonistic pre-mRNA splicing factors*. *RNA* (New York, NY 4, 430-444.
- Hassfeld, W., Chan, E.K., Mathison, D.A., Portman, D., Dreyfuss, G., Steiner, G., and Tan, E.M.** (1998). *Molecular definition of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein R (hnRNP R) using autoimmune antibody: immunological relationship with hnRNP P*. *Nucleic acids research* 26, 439-445.
- Horowitz, D.S., and Krainer, A.R.** (1994). *Mechanisms for selecting 5' splice sites in mammalian pre-mRNA splicing*. *Trends Genet* 10, 100-106.
- Hutchison, S., LeBel, C., Blanchette, M., and Chabot, B.** (2002). *Distinct sets of adjacent heterogeneous nuclear ribonucleoprotein (hnRNP) A1/A2 binding sites control 5' splice site selection in the hnRNP A1 mRNA precursor*. *The Journal of biological chemistry* 277, 29745-29752.

**Izaurralde, E., Jarmolowski, A., Beisel, C., Mattaj, I.W., Dreyfuss, G., and Fischer, U. (1997).** *A role for the M9 transport signal of hnRNP A1 in mRNA nuclear export.* The Journal of cell biology 137, 27-35.

**Izquierdo, J.M., Majos, N., Bonnal, S., Martinez, C., Castelo, R., Guigo, R., Bilbao, D., and Valcarcel, J. (2005).** *Regulation of Fas alternative splicing by antagonistic effects of TIA-1 and PTB on exon definition.* Molecular cell 19, 475-484.

**Jamison, S.F., Pasman, Z., Wang, J., Will, C., Luhrmann, R., Manley, J.L., and Garcia-Blanco, M.A. (1995).** *U1 snRNP-ASF/SF2 interaction and 5' splice site recognition: characterization of required elements.* Nucleic acids research 23, 3260-3267.

**Jiang, Z., Tang, H., Havlioglu, N., Zhang, X., Stamm, S., Yan, R., and Wu, J.Y. (2003).** *Mutations in tau gene exon 10 associated with FTDP-17 alter the activity of an exonic splicing enhancer to interact with Tra2 beta.* The Journal of biological chemistry 278, 18997-19007.

**Johnson, J.M., Castle, J., Garrett-Engle, P., Kan, Z., Loerch, P.M., Armour, C.D., Santos, R., Schadt, E.E., Stoughton, R., and Shoemaker, D.D. (2003).** *Genome-wide survey of human alternative pre-mRNA splicing with exon junction microarrays.* Science 302, 2141-2144.

**Kampa, D., Cheng, J., Kapranov, P., Yamanaka, M., Brubaker, S., Cawley, S., Drenkow, J., Piccolboni, A., Bekiranov, S., Helt, G., *et al.* (2004).** *Novel RNAs identified from an in-depth analysis of the transcriptome of human chromosomes 21 and 22.* Genome research 14, 331-342.

**Kan, J.L., and Green, M.R. (1999).** *Pre-mRNA splicing of IgM exons M1 and M2 is directed by a juxtaposed splicing enhancer and inhibitor.* Genes & development 13, 462-471.

**Kanopka, A., Muhlemann, O., and Akusjarvi, G. (1996).** *Inhibition by SR proteins of splicing of a regulated adenovirus pre-mRNA.* Nature 381, 535-538.

**Kondo, S., Yamamoto, N., Murakami, T., Okumura, M., Mayeda, A., and Imaizumi, K. (2004).** *Tra2 beta, SF2/ASF and SRp30c modulate the function of an exonic splicing enhancer in exon 10 of tau pre-mRNA.* Genes Cells 9, 121-130.

**Konig, H., Ponta, H., and Herrlich, P. (1998).** *Coupling of signal transduction to alternative pre-mRNA splicing by a composite splice regulator.* The EMBO journal 17, 2904-2913.

**Krainer, A.R., Conway, G.C., and Kozak, D. (1990).** *The essential pre-mRNA splicing factor SF2 influences 5' splice site selection by activating proximal sites.* Cell 62, 35-42.



- Krainer, A.R., Maniatis, T., Ruskin, B., and Green, M.R.** (1984). *Normal and mutant human beta-globin pre-mRNAs are faithfully and efficiently spliced in vitro.* Cell 36, 993-1005.
- LaBranche, H., Dupuis, S., Ben-David, Y., Bani, M.R., Wellinger, R.J., and Chabot, B.** (1998). *Telomere elongation by hnRNP A1 and a derivative that interacts with telomeric repeats and telomerase.* Nature genetics 19, 199-202.
- Lander, E.S., Linton, L.M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M.C., Baldwin, J., Devon, K., Dewar, K., Doyle, M., FitzHugh, W., et al.** (2001). *Initial sequencing and analysis of the human genome.* Nature 409, 860-921.
- Lavigne, A., La Branche, H., Kornblihtt, A.R., and Chabot, B.** (1993). *A splicing enhancer in the human fibronectin alternate ED1 exon interacts with SR proteins and stimulates U2 snRNP binding.* Genes & development 7, 2405-2417.
- Li, Y., and Blencowe, B.J.** (1999). *Distinct factor requirements for exonic splicing enhancer function and binding of U2AF to the polypyrimidine tract.* The Journal of biological chemistry 274, 35074-35079.
- Lin, C.H., and Patton, J.G.** (1995). *Regulation of alternative 3' splice site selection by constitutive splicing factors.* RNA (New York, NY 1, 234-245.
- Liu, H.X., Zhang, M., and Krainer, A.R.** (1998). *Identification of functional exonic splicing enhancer motifs recognized by individual SR proteins.* Genes & development 12, 1998-2012.
- Lopez-Bigas, N., Audit, B., Ouzounis, C., Parra, G., and Guigo, R.** (2005). *Are splicing mutations the most frequent cause of hereditary disease?* FEBS letters 579, 1900-1903.
- Lou, H., Helfman, D.M., Gagel, R.F., and Berget, S.M.** (1999). *Polypyrimidine tract-binding protein positively regulates inclusion of an alternative 3'-terminal exon.* Molecular and cellular biology 19, 78-85.
- Markovtsov, V., Nikolic, J.M., Goldman, J.A., Turck, C.W., Chou, M.Y., and Black, D.L.** (2000). *Cooperative assembly of an hnRNP complex induced by a tissue-specific homolog of polypyrimidine tract binding protein.* Molecular and cellular biology 20, 7463-7479.
- Martinez-Contreras, R., Fiset, J.F., Nasim, F.U., Madden, R., Cordeau, M., and Chabot, B.** (2006). *Intronic binding sites for hnRNP A/B and hnRNP F/H proteins stimulate pre-mRNA splicing.* PLoS biology 4, e21.
- Matlin, A.J., Clark, F., and Smith, C.W.** (2005). *Understanding alternative splicing: towards a cellular code.* Nat Rev Mol Cell Biol 6, 386-398.

- Matter, N., Marx, M., Weg-Remers, S., Ponta, H., Herrlich, P., and Konig, H.** (2000). *Heterogeneous ribonucleoprotein A1 is part of an exon-specific splice-silencing complex controlled by oncogenic signaling pathways*. The Journal of biological chemistry 275, 35353-35360.
- Mayeda, A., and Krainer, A.R.** (1992). *Regulation of alternative pre-mRNA splicing by hnRNP A1 and splicing factor SF2*. Cell 68, 365-375.
- Mayeda, A., Munroe, S.H., Caceres, J.F., and Krainer, A.R.** (1994). *Function of conserved domains of hnRNP A1 and other hnRNP A/B proteins*. The EMBO journal 13, 5483-5495.
- Merendino, L., Guth, S., Bilbao, D., Martinez, C., and Valcarcel, J.** (1999). *Inhibition of msl-2 splicing by Sex-lethal reveals interaction between U2AF35 and the 3' splice site AG*. Nature 402, 838-841.
- Merrill, B.M., Stone, K.L., Cobianchi, F., Wilson, S.H., and Williams, K.R.** (1988). *Phenylalanines that are conserved among several RNA-binding proteins form part of a nucleic acid-binding pocket in the A1 heterogeneous nuclear ribonucleoprotein*. The Journal of biological chemistry 263, 3307-3313.
- Michael, W.M., Choi, M., and Dreyfuss, G.** (1995). *A nuclear export signal in hnRNP A1: a signal-mediated, temperature-dependent nuclear protein export pathway*. Cell 83, 415-422.
- Mulligan, G.J., Guo, W., Wormsley, S., and Helfman, D.M.** (1992). *Polypyrimidine tract binding protein interacts with sequences involved in alternative splicing of beta-tropomyosin pre-mRNA*. The Journal of biological chemistry 267, 25480-25487.
- Nasim, F.U., Hutchison, S., Cordeau, M., and Chabot, B.** (2002). *High-affinity hnRNP A1 binding sites and duplex-forming inverted repeats have similar effects on 5' splice site selection in support of a common looping out and repression mechanism*. RNA (New York, NY 8, 1078-1089.
- Nasim, M.T., Chernova, T.K., Chowdhury, H.M., Yue, B.G., and Eperon, I.C.** (2003). *HnRNP G and Tra2beta: opposite effects on splicing matched by antagonism in RNA binding*. Human molecular genetics 12, 1337-1348.
- Nayler, O., Stratling, W., Bourquin, J.P., Stagljar, I., Lindemann, L., Jasper, H., Hartmann, A.M., Fackelmayer, F.O., Ullrich, A., and Stamm, S.** (1998). *SAF-B protein couples transcription and pre-mRNA splicing to SAR/MAR elements*. Nucleic acids research 26, 3542-3549.
- Nilsen, T.W.** (1994). *RNA-RNA interactions in the spliceosome: unraveling the ties that bind*. Cell 78, 1-4.

- Norton, P.A.** (1994). *Polypyrimidine tract sequences direct selection of alternative branch sites and influence protein binding*. Nucleic acids research 22, 3854-3860.
- Oberstrass, F.C., Auweter, S.D., Erat, M., Hargous, Y., Henning, A., Wenter, P., Reymond, L., Amir-Ahmady, B., Pitsch, S., Black, D.L., et al.** (2005). *Structure of PTB bound to RNA: specific binding and implications for splicing regulation*. Science 309, 2054-2057.
- Pagani, F., and Baralle, F.E.** (2004). *Genomic variants in exons and introns: identifying the splicing spoilers*. Nature reviews 5, 389-396.
- Patton, J.G., Mayer, S.A., Tempst, P., and Nadal-Ginard, B.** (1991). *Characterization and molecular cloning of polypyrimidine tract-binding protein: a component of a complex necessary for pre-mRNA splicing*. Genes & development 5, 1237-1251.
- Perez, I., Lin, C.H., McAfee, J.G., and Patton, J.G.** (1997a). *Mutation of PTB binding sites causes misregulation of alternative 3' splice site selection in vivo*. RNA (New York, NY 3, 764-778.
- Perez, I., McAfee, J.G., and Patton, J.G.** (1997b). *Multiple RRM's contribute to RNA binding specificity and affinity for polypyrimidine tract binding protein*. Biochemistry 36, 11881-11890.
- Petersen-Mahrt, S.K., Estmer, C., Ohrmalm, C., Matthews, D.A., Russell, W.C., and Akusjarvi, G.** (1999). *The splicing factor-associated protein, p32, regulates RNA splicing by inhibiting ASF/SF2 RNA binding and phosphorylation*. The EMBO journal 18, 1014-1024.
- Raffetseder, U., Frye, B., Rauen, T., Jurchott, K., Royer, H.D., Jansen, P.L., and Mertens, P.R.** (2003). *Splicing factor SRp30c interaction with Y-box protein-1 confers nuclear YB-1 shuttling and alternative splice site selection*. The Journal of biological chemistry 278, 18241-18248.
- Schmucker, D., Clemens, J.C., Shu, H., Worby, C.A., Xiao, J., Muda, M., Dixon, J.E., and Zipursky, S.L.** (2000). *Drosophila Dscam is an axon guidance receptor exhibiting extraordinary molecular diversity*. Cell 101, 671-684.
- Sharp, P.A.** (1994). *Split genes and RNA splicing*. Cell 77, 805-815.
- Shen, H., Kan, J.L., Ghigna, C., Biamonti, G., and Green, M.R.** (2004). *A single polypyrimidine tract binding protein (PTB) binding site mediates splicing inhibition at mouse IgM exons M1 and M2*. RNA (New York, NY 10, 787-794.
- Shin, C., and Manley, J.L.** (2002). *The SR protein SRp38 represses splicing in M phase cells*. Cell 111, 407-417.

- Simard, M.J., and Chabot, B. (2000).** *Control of hnRNP A1 alternative splicing: an intron element represses use of the common 3' splice site.* Molecular and cellular biology 20, 7353-7362.
- Simard, M.J., and Chabot, B. (2002).** *SRp30c is a repressor of 3' splice site utilization.* Molecular and cellular biology 22, 4001-4010.
- Smith, C.W., and Valcarcel, J. (2000).** *Alternative pre-mRNA splicing: the logic of combinatorial control.* Trends in biochemical sciences 25, 381-388.
- Southby, J., Gooding, C., and Smith, C.W. (1999).** *Polypyrimidine tract binding protein functions as a repressor to regulate alternative splicing of alpha-actinin mutually exclusive exons.* Molecular and cellular biology 19, 2699-2711.
- Staknis, D., and Reed, R. (1995).** *Members of a family of proteins (the RD family) detected by a U1 70K monoclonal antibody are present in spliceosomal complexes.* Nucleic acids research 23, 4081-4086.
- Stoss, O., Novoyatleva, T., Gencheva, M., Olbrich, M., Benderska, N., and Stamm, S. (2004).** *p59(fyn)-mediated phosphorylation regulates the activity of the tissue-specific splicing factor rSLM-1.* Molecular and cellular neurosciences 27, 8-21.
- Stoss, O., Olbrich, M., Hartmann, A.M., Konig, H., Memmott, J., Andreadis, A., and Stamm, S. (2001).** *The STAR/GSG family protein rSLM-2 regulates the selection of alternative splice sites.* The Journal of biological chemistry 276, 8665-8673.
- Stoss, O., Schwaiger, F.W., Cooper, T.A., and Stamm, S. (1999).** *Alternative splicing determines the intracellular localization of the novel nuclear protein Nop30 and its interaction with the splicing factor SRp30c.* The Journal of biological chemistry 274, 10951-10962.
- Tacke, R., and Manley, J.L. (1995).** *The human splicing factors ASF/SF2 and SC35 possess distinct, functionally significant RNA binding specificities.* The EMBO journal 14, 3540-3551.
- Valcarcel, J., and Gebauer, F. (1997).** *Post-transcriptional regulation: the dawn of PTB.* Curr Biol 7, R705-708.
- Wagner, E.J., and Garcia-Blanco, M.A. (2001).** *Polypyrimidine tract binding protein antagonizes exon definition.* Molecular and cellular biology 21, 3281-3288.
- Wang, J., and Manley, J.L. (1995).** *Overexpression of the SR proteins ASF/SF2 and SC35 influences alternative splicing in vivo in diverse ways.* RNA (New York, NY) 1, 335-346.

**Wang, Y., Wang, J., Gao, L., Lafyatis, R., Stamm, S., and Andreadis, A. (2005).** *Tau exons 2 and 10, which are misregulated in neurodegenerative diseases, are partly regulated by silencers which bind a SRp30c.SRp55 complex that either recruits or antagonizes htra2beta1.* The Journal of biological chemistry 280, 14230-14239.

**Wollerton, M.C., Gooding, C., Wagner, E.J., Garcia-Blanco, M.A., and Smith, C.W. (2004).** *Autoregulation of polypyrimidine tract binding protein by alternative splicing leading to nonsense-mediated decay.* Molecular cell 13, 91-100.

**Wu, S., Romfo, C.M., Nilsen, T.W., and Green, M.R. (1999).** *Functional recognition of the 3' splice site AG by the splicing factor U2AF35.* Nature 402, 832-835.

**Xu, Q., Leung, D.Y., and Kisich, K.O. (2003).** *Serine-arginine-rich protein p30 directs alternative splicing of glucocorticoid receptor pre-mRNA to glucocorticoid receptor beta in neutrophils.* The Journal of biological chemistry 278, 27112-27118.

**Yang, X., Bani, M.R., Lu, S.J., Rowan, S., Ben-David, Y., and Chabot, B. (1994).** *The A1 and A1B proteins of heterogeneous nuclear ribonucleoparticles modulate 5' splice site selection in vivo.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 91, 6924-6928.

**Young, P.J., DiDonato, C.J., Hu, D., Kothary, R., Androphy, E.J., and Lorson, C.L. (2002).** *SRp30c-dependent stimulation of survival motor neuron (SMN) exon 7 inclusion is facilitated by a direct interaction with hTra2 beta 1.* Human molecular genetics 11, 577-587.

**Zahler, A.M., Lane, W.S., Stolk, J.A., and Roth, M.B. (1992).** *SR proteins: a conserved family of pre-mRNA splicing factors.* Genes & development 6, 837-847.

**Zheng, Z.M., Huynen, M., and Baker, C.C. (1998).** *A pyrimidine-rich exonic splicing suppressor binds multiple RNA splicing factors and inhibits spliceosome assembly.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 95, 14088-14093.

**Zhu, J., Mayeda, A., and Krainer, A.R. (2001).** *Exon identity established through differential antagonism between exonic splicing silencer-bound hnRNP A1 and enhancer-bound SR proteins.* Molecular cell 8, 1351-1361.

**Zorio, D.A., and Blumenthal, T. (1999).** *Both subunits of U2AF recognize the 3' splice site in Caenorhabditis elegans.* Nature 402, 835-838.